

**Synthese von molekularen Werkzeugen zur
Visualisierung und Untersuchung des Sphingolipid-
metabolismus und weiterer biologischer Prozesse**



Dissertation

zur Erlangung des wissenschaftlichen Doktorgrades

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Julian Fink

aus Heilbronn

Würzburg, 2021



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.06.2017 bis zum 15.12.2021
am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jürgen Seibel angefertigt.

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Seibel

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: Prof. Dr. Jürgen Seibel

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Publikationen

1. T. Wiese, F. Dennstädt, C. Hollmann, S. Stonawski, C. Wurst, **J. Fink**, E. Gorte, P. Mandasari, K. Domschke, L. Hommers, B. Vanhove, F. Schumacher, B. Kleuser, J. Seibel, J. Rohr, M. Buttman, A. Menke, J. Schneider-Schaulies, N. Beyersdorf, *Brain Commun.* **2020**, fcab020: Inhibition of acid sphingomyelinase increases regulatory T cells in humans.
2. S. Peters, L. Kaiser, **J. Fink**, F. Schumacher, V. Perschin, J. Schlegel, M. Sauer, C. Stigloher, B. Kleuser, J. Seibel, A. Schubert-Unkmeir, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4300: Click-correlative light and electron microscopy (click-AT-CLEM) for imaging and tracking azido-functionalized sphingolipids in bacteria.
3. **J. Fink**, F. Schumacher, J. Schlegel, P. Stenzel, D. Wigger, M. Sauer, B. Kleuser, J. Seibel, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 2203–2212: Azidosphinganine enables metabolic labeling and detection of sphingolipid *de novo* synthesis.
4. R. Götz, T. C. Kunz, **J. Fink**, F. Solger, J. Schlegel, J. Seibel, V. Kozjak-Pavlovic, T. Rudel, M. Sauer, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6173: Nanoscale imaging of bacterial infections by sphingolipid expansion microscopy.
5. **J. Fink**, J. Seibel, E. Avota, *Methods in Molecular Biology: Lipid Rafts – Methods and Protocols* (Ed.: E. Bieberich), Humana, New York, **2021**, *2187*, 313–325: Detection of Functionalized Sphingolipid Analogs in Detergent-Resistant Membranes of Immune Cells.
6. K. Rajeeve, N. Vollmuth, S. Janaki-Raman, T. F. Wulff, A. Baluapuri, F. R. Dejure, C. Huber, **J. Fink**, M. Schmalhofer, W. Schmitz, R. Sivadasan, M. Eilers, E. Wolf, W. Eisenreich, A. Schulze, J. Seibel, T. Rudel, *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 1390–1402: Reprogramming of host glutamine metabolism during *Chlamydia trachomatis* infection and its key role in peptidoglycan synthesis.
7. F. Solger, T. C. Kunz, **J. Fink**, K. Paprotka, P. Pfister, F. Hagen, F. Schumacher, B. Kleuser, J. Seibel, T. Rudel, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 215: A Role of Sphingosine in the Intracellular Survival of *Neisseria gonorrhoeae*.

8. J. Lang, P. Bohn, H. Bhat, H. Jastrow, B. Walkenfort, F. Cansiz, **J. Fink**, M. Bauer, D. Olszewski, A. Ramos-Nascimento, V. Duhan, S.-K. Friedrich, K. A. Becker, A. Krawczyk, M. J. Edwards, A. Burchert, M. Huber, J. Friebus-Kardash, J. R. Göthert, C. Hardt, H. C. Probst, F. Schumacher, K. Köhrer, B. Kleuser, E. B. Babiyshuk, B. Sodeik, J. Seibel, U. F. Greber, P. A. Lang, E. Gulbins, K. S. Lang, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1338: Acid ceramidase of macrophages traps herpes simplex virus in multivesicular bodies and protects from severe disease.
9. C. Hollmann, T. Wiese, F. Dennstädt, **J. Fink**, J. Schneider-Schaulies, N. Beyersdorf, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2363: Translational Approaches Targeting Ceramide Generation From Sphingomyelin in T Cells to Modulate Immunity in Humans.
10. **J. Fink**, J. Seibel, *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 1157–1168: Click reactions with functional sphingolipids.

Konferenz- und Tagungsbeiträge

1. Indo-German Workshop “Multivalent and Adaptive Bioinspired Materials”, Essen, 25.–27.09.2019, Posterpräsentation: “*Synthesis of Molecular Tools for the Enlightenment of Biological Processes*”.
2. Retreat: Collaborative Research Centre 1039 “Signalling by fatty acid derivatives and sphingolipids in health and disease” (CRC 1039) & Research Group 2123 “Sphingolipid dynamics in infection control” (FOR 2123) & Research Training Group 2098 “Biomedicine of Sphingolipids” (GRK 2098), Rauschholzhausen, 05.–07.03.2019, Posterpräsentation: “*Synthesis of Functional Sphingolipids for Elucidating Biological Events*”.
3. Retreat der Forschergruppe 2123 “Sphingolipid dynamics in infection control“, Volkach, 18.10.2018, Vortrag: “*Synthesis of Sphingolipid Analogues for Elucidating Biological Events*”.
4. International Workshop “Sphingolipids – from basic science to novel therapeutic concepts”, Würzburg, 28.–30.06.2018, Posterpräsentation: “*Synthesis of Functional Sphingolipids for Elucidating Biological Events*”.

Meiner Familie

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei *Herrn Prof. Dr. Jürgen Seibel* für seine Betreuung und Förderung der letzten Jahre in seinem Arbeitskreis bedanken. Das Mitwirken innerhalb zahlreicher Projekte mit verschiedenen Kooperationspartnern ermöglichte mir den Einblick in andere naturwissenschaftliche Disziplinen und erweiterte somit meine Kenntnisse, vor allem im Bereich der Biologie. Zudem möchte ich mich für das von ihm entgegengebrachte Vertrauen bezüglich der Gestaltung dieser Doktorarbeit und seine vielen interessanten Projektideen bedanken. Ein Großteil meiner akademischen Ausbildung und die Weiterentwicklung als Chemiker verdanke ich der Mitgliedschaft im „AK Seibel“.

Für die Möglichkeit der interdisziplinären Zusammenarbeit innerhalb des SphingoFOR- und GRK-Teams, den regen Austausch an wissenschaftlichen Ideen und die gemeinsam erzielten Ergebnisse danke ich allen beteiligten Kooperationspartnern. Hier möchte ich insbesondere *Judith Lang* (AG Prof. Dr. Karl Lang), *Franziska Solger* (AG Prof. Dr. Thomas Rudel), *Teresa Wiese* und *Sascha Eder* (AG Dr. Niklas Beyersdorf), *Ralph Götz* und *Tobias Kunz* (AG Prof. Dr. Markus Sauer), *Simon Peters* (AG Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir), *Dr. Elita Avota* und *Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies* erwähnen. Für die erfolgreiche Kooperation mit *Thomas Klein* (AG Prof. Dr. Nurcan Üçeyler) bedanke ich mich ebenfalls.

Ein ganz großer Dank geht an *Jan Schlegel* (AG Prof. Dr. Markus Sauer) – der beste Mann am Mikroskop – für die unglaubliche Hingabe zu seiner Arbeit, die Entwicklung neuer spannender Forschungsideen, aber auch für die Wertschätzung der Arbeit anderer. Es war mir immer eine große Freude mit dir zusammengearbeitet zu haben, auch in meinem „Biopraktikum“.

Zudem möchte ich *Fabian Schumacher* und *Dominik Wigger* (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser) für die ausgezeichnete Expertise im Bereich der Massenspektrometrie und deren Engagement zur Umsetzung unterschiedlicher Projekte hervorheben, die einen sehr wichtigen Teil zu dieser Dissertation beitrugen. Vielen herzlichen Dank an euch beide!

Ein besonderer Dank geht an *Christine Sternstein*, *Sebastian Bauer*, *Malte Jürgensen*, *Anna Lamprecht*, *Maximilian Dietz*, *Philipp Stenzel* und *Pauline Pfister*, die mich im Rahmen ihrer Masterpraktika oder Bachelorarbeiten fleißig unterstützten.

Zusätzlich bedanke ich mich bei den Serviceabteilungen und der Verwaltung des Instituts. Hier möchte ich vor allem *Juliane Adelman* für die Messungen von Massenspektren, *Dr. Matthias Grüne* und *Patricia Altenberger* für die NMR-Messungen und *Christiana Toussaint* für die Abwicklung vieler verwaltungstechnischer Angelegenheiten erwähnen. Außerdem gilt mein Dank *Marvin Grüne* für die Hilfestellung bei Problemen oder Fragen zur NMR-Spektroskopie.

Des Weiteren danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für die angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb des Labors. Hervorheben möchte ich hier *Jonas Rauch*, mit dem ich sehr gerne die Gute-Laune-Bench geteilt habe.

Sabine Reising, Natalia Dannhäuser, Julia Ertl, Pauline Pfister, Philipp Stenzel und *Sebastian Bauer* danke ich nicht nur für deren stetige Unterstützung und Motivation, sondern auch für die schönen und spaßigen Freizeitaktivitäten. Für eure berufliche und private Zukunft wünsche ich euch von Herzen nur das Beste! Ich freue mich schon auf die nächsten Skypegespräche und viele weitere Treffen.

Weiterer Dank geht an *Bernd Grünewald, Benjamin Kiendl, Sarah Schweeberg* und *Julia Merz*, die während meines Studiums viel Zeit und Herzblut in meine Ausbildung investierten und somit meinen Werdegang als Chemiker stark prägten. Ich danke euch für alles was ich von euch lernen durfte.

Der größte Dank gebührt meiner Familie, Tommy und meinen Freunden für ihre bedingungslose Unterstützung in meiner gesamten Studien- und Promotionszeit, ohne die diese Arbeit erst gar nicht möglich gewesen wäre. Danke für euer Verständnis und dass ihr mir, vor allem in schwierigen Phasen, immer wieder gezeigt habt, was im Leben wirklich wichtig ist!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Bioorthogonale Markierung	3
2.1.1	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC).....	6
2.1.2	Spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC).....	9
2.1.3	Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA).....	12
2.2	Sphingolipide	14
2.2.1	Aufbau der Sphingolipide	14
2.2.2	Biosynthese und Metabolismus der Sphingolipide	16
2.2.3	Sphingolipide in der Signaltransduktion	22
2.2.4	Antibakterielle Wirkung von Sphingolipiden	24
2.2.5	Chemische Synthese von Sphingolipiden	27
2.2.6	Fluoreszenzmarkierte Sphingolipide.....	35
2.2.7	Bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipide	38
3	Zielsetzung	45
4	Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	Sphingolipide und deren funktionalisierte Derivate zur Untersuchung biologischer Prozesse.....	47
4.1.1	Aufbau des Sphingolipidgrundgerüsts	47
4.1.2	Natürliche Sphingolipide.....	56
4.1.3	Bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipidderivate	59
4.1.3.1	Ceramide mit azidfunktionalisierten Seitenketten	59
4.1.3.2	Bifunktionelles Amino(azido)ceramid.....	66
4.1.3.3	Cyclooctenfunktionalisierte Ceramide	75
4.1.3.4	ω -Azidosphingosin.....	79
4.1.3.5	Ceramide mit azidfunktionalisiertem Sphingolipidgrundgerüst	90
4.1.3.6	ω -Azidosphinganin	91
4.1.3.7	1-Azidosphingolipide	110
4.1.4	Atypische Sphingolipide: Sphinganin- und S1P-Analoga	118
5	Zusammenfassung	131

6	Summary	145
7	Experimentalteil	157
7.1	Materialien, Geräte und Methoden.....	157
7.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	157
7.1.2	Gase.....	157
7.1.3	Dünnschichtchromatographie (DC)	157
7.1.4	Säulenchromatographie.....	158
7.1.5	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	158
7.1.6	Massenspektrometrie (MS)	159
7.1.7	Weitere Geräte.....	159
7.2	Synthesevorschriften	160
7.2.1	Synthese wichtiger Vorstufen der Sphingolipidkopfmotive	160
7.2.2	Synthese natürlicher Sphingolipide: Sphingosin und Ceramide	168
7.2.3	Synthese von azidfunktionalisierten Carbonsäuren	177
7.2.4	Synthese von Ceramiden mit azidfunktionalisierten Seitenketten.....	180
7.2.5	Synthese des bifunktionellen Amino(azido)ceramids.....	186
7.2.6	Synthese der cyclooctenfunktionalisierten Ceramide	193
7.2.7	Synthese von ω -Azidosphingosin	200
7.2.8	Synthese von Ceramiden mit azidfunktionalisiertem Grundgerüst.....	206
7.2.9	Synthese von ω -Azidosphinganin.....	210
7.2.10	Sphinganin-Click-Modifikation	219
7.2.11	Synthese der 1-Azidosphingolipide.....	221
7.2.12	Vorversuche zur Synthese der atypischen Sphingolipide	228
7.2.13	Synthese atypischer Sphingolipide: Sphinganin- und S1P-Analoga.....	233
8	Literaturverzeichnis.....	245
9	Anhang	259
9.1	Abkürzungsverzeichnis	259
9.1.1	Abkürzungen NMR.....	265
9.1.2	Abkürzungen Massenspektrometrie	265
10	Eidesstattliche Erklärung	267

1 Einleitung

„Lange Zeit hindurch war die Anatomie, insbesondere die Anatomie des menschlichen Körpers das α und ω der wissenschaftlichen Kenntnisse. Der weitere Fortschritt wurde erst durch die Entdeckung des Mikroskops ermöglicht. Lange Zeiten mußten noch verfließen, bis durch Schwann die Zelle als die letzte biologische Einheit erwiesen wurde. Es hieße Eulen nach Athen tragen, wenn ich hier an dieser Stelle die unabsehbaren Fortschritte, welche die Biologie in allen ihren Fächern der Einführung des Zellbegriffs zu verdanken hat, schildern wollte. Ist doch dieser Begriff die Achse, um welche die ganze moderne Wissenschaft vom Leben gravitiert.“

Dies waren die Worte des deutschen Arztes und Forschers Professor Paul Ehrlich über die zentrale Bedeutung der Zelle – der kleinsten Einheit des Lebens – bei seinem Nobelpreisvortrag am 11. Dezember 1908 in Stockholm.^[1,2] P. Ehrlich, der heute als Gründervater der Chemotherapie gilt, kombinierte in seinen serologischen und immunologischen Studien die Bereiche Medizin, Chemie und Biologie. Er entwickelte unter anderem mit Hilfe von Farbstoffen verschiedene Färbemethoden von Zellen für deren mikroskopische Untersuchung und legte damit einen weiteren Grundstein für die Entwicklung lebensrettender Medikamente.^[3]

Heute ermöglicht die spezifische Markierung und Visualisierung bestimmter Biomoleküle bzw. Zellstrukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen zusammen mit der Lichtmikroskopie die dreidimensionale Untersuchung von lebenden Zellen und Gewebe ohne den zerstörerischen Einfluss energiereicher Elektronen.^[4,5] Es gibt verschiedene Herangehensweisen, um die Fluoreszenzmarkierung eines zu untersuchenden Biomoleküls zu erreichen. Zum einen können farbstoffgekoppelte Antikörper oder Toxine verwendet werden, die das Biomolekül adressieren, zum anderen kann die fluoreszierende Einheit durch vorherige chemische Synthese auch direkt am Biomolekül angebracht worden sein. Letzteres erlaubt aufgrund des geringen Abstands zum Fluorophor eine direkte und präzise Lokalisation.^[6-8] So ist es keinesfalls verwunderlich, dass bereits eine Vielzahl an farbstoffgebundenen Biomolekülen für lichtmikroskopische Zwecke synthetisiert wurden und kommerziell erhältlich sind (z. B. NBD-C₆-Ceramid).^[9,10] Dennoch besitzen diese Analoga den Nachteil, dass vor allem bei kleinen Biomolekülen die Polarität und Größe durch den Farbstoffrest stark verändert wird. Handelt es sich dann noch um das „gleiche“ Molekül mit denselben biochemischen Eigenschaften oder wird es an einer unerwünschten Stelle innerhalb der Zelle eingebaut bzw. anders metabolisiert?

Als Lösungsansatz werden häufig bioorthogonal funktionalisierte Biomoleküle eingesetzt, die z. B. mit einer kleinen Azid- oder Alkingruppe lediglich geringfügig modifiziert sind und sich

biologisch wie die natürlichen Substrate verhalten. Nach dem Einbau in die Zelle erfolgt eine schnelle und selektive Konjugation mit einer komplementär funktionalisierten Sonde.^[11] Das zu untersuchende Biomolekül wird erst zu einem gewünschten Zeitpunkt hochspezifisch durch chemische Reaktionen, meist sogenannte „Click-Reaktionen“, mit Farbstoffen visualisiert. Diese Technik wird beispielsweise bei Kohlenhydraten, Aminosäuren, Peptiden, der DNA und Lipiden eingesetzt und kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, ohne dabei die zellulären Prozesse zu stören.^[12,13] Werden dabei photoschaltbare Farbstoffe und die neuesten Fluoreszenzmikroskopietechniken eingesetzt, sind präzise Darstellungen weit unterhalb der von Ernst Abbe und Baron Reyleigh postulierten maximalen natürlichen Auflösungsgrenze von 200 Nanometern (Abbe-Limit) möglich.^[5,14-17] Nun können detaillierte Aufnahmen von biochemischen Prozessen, wie Stoffwechselfvorgängen und Wechselwirkungen innerhalb der Zelle, mit einer Auflösung von ca. 20–70 Nanometern in Echtzeit erhalten werden.

Im Bereich der Sphingolipide stellt die bioorthogonale Markierung eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung des hochkomplexen Sphingolipidmetabolismus und der beteiligten Enzyme dar.^[18,19] Zusätzlich können im Rahmen der *Lipidomics* mit neuesten hochauflösenden massenspektrometrischen Analysetechniken neben einer umfassenden Strukturaufklärung auch Einsichten bezüglich der Funktionen von Sphingolipiden erhalten werden.^[20,21] Dies ist von großem medizinischem Interesse, da Störungen des Sphingolipidgleichgewichts mit einer Vielzahl an Krankheiten wie Krebs, Alzheimer oder Diabetes zusammenhängen.^[22,23]

Für die Aufklärung komplexer Zellprozesse ist also die interdisziplinäre Kooperation zwischen Physik, Biologie und Chemie gefragt. Mit den immer besser werdenden Mess- und Analysetechniken, dem wachsenden Anspruch bezüglich Auflösung und Kontrast bei der Bildgebung sowie Selektivität bei der Verfolgung von Biomolekülen muss sich auch die Chemie stets weiterentwickeln. Um diesen Anforderungen Folge zu leisten, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Synthese und Charakterisierung molekularer Werkzeuge, die mit verschiedenen Mikroskopie- und Massenspektrometriemethoden die Visualisierung und Untersuchung des Sphingolipidmetabolismus und weiterer biologischer Prozesse ermöglichen.

Die hier vorgestellten Verbindungen tragen dazu bei, die Rolle von Sphingolipiden bei Infektionsprozessen und Krankheitsverläufen auf molekularer Ebene aufzuklären. Das dadurch gewonnene verbesserte Verständnis über hochkomplexe Zellvorgänge liefert einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung innovativer therapeutischer Ansätze zur Behandlung verschiedener Krankheiten und neuer Wirkstoffe gegen pathogene Erreger wie Bakterien oder Viren.

2 Grundlagen

2.1 Bioorthogonale Markierung

Eine effektive Methode zur gezielten Untersuchung bestimmter Moleküle in biologischen Systemen ist deren Markierung mit einer funktionellen Gruppe, die nicht oder nur äußerst selten in der Natur vorkommt (Reporter). Diese Markierung ermöglicht bioorthogonale Reaktionen mit komplementär funktionalisierten Verbindungen (Sonden), die ebenfalls eine nicht natürliche Funktionalität enthalten und somit für eine hohe Selektivität der Konjugation sorgen. Dabei kommt es weder zu einer Interaktion noch zu einer Störung des biologischen Systems.^[24-26] Die Einführung der bioorthogonalen Funktionalität des Reporter-moleküls kann chemisch oder biosynthetisch (genetisch, enzymatisch) erfolgen.^[27] Durch die Zugabe der Sonde mit komplementärer Funktionalität findet dann die spezifische und schnelle Reaktion mit dem Reporter statt. Dabei können je nach biologischer Fragestellung verschiedene Sonden wie Fluorophore für die Fluoreszenzmikroskopie oder Biotin für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden.^[28,29] Wichtig ist, dass die beiden beteiligten Funktionalitäten des Reporters und der Sonde unter physiologischen Bedingungen stabil und gegenüber funktionellen Gruppen des biologischen Systems wie Phosphat-, Amino- und Hydroxygruppen inert sind (Abbildung 1). Zudem dürfen die bioorthogonalen Funktionalitäten für Untersuchungen in lebenden Zellen und Organismen keine Toxizität aufweisen. Des Weiteren sollte die eingeführte funktionelle Gruppe möglichst klein sein, sodass native Eigenschaften des Derivats erhalten bleiben.^[12,24,30]

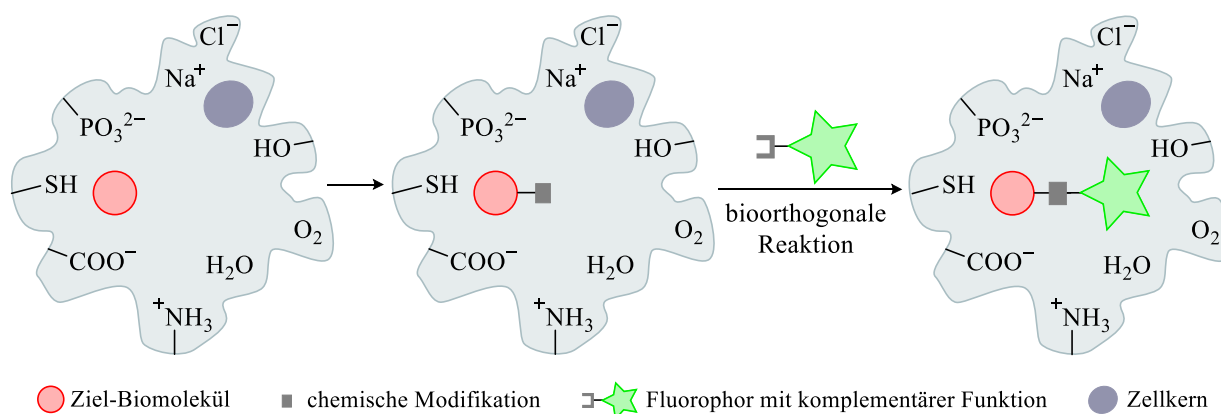


Abbildung 1: Prinzip der bioorthogonalen Markierung: Das zu untersuchende Molekül eines biologischen Systems (hier: Zelle) wird selektiv mit einer bioorthogonalen Funktionalität modifiziert bzw. als funktionalisiertes Derivat metabolisch eingebaut (Reporter). Anschließend erfolgt die spezifische Reaktion des gewünschten Biomoleküls mit einem komplementär funktionalisierten Fluorophor (Sonde) unter physiologischen Bedingungen.

Eine Funktionalität, die in biologischen Systemen nicht vorkommt und somit tatsächlich als orthogonal gegenüber den meisten funktionellen Gruppen in natürlicher Umgebung bezeichnet werden kann, ist die Azidgruppe.^[31,32] Ihr geringer sterischer Anspruch sowie die kinetische Stabilität unter physiologischen Bedingungen führen dazu, dass sich die azidfunktionalisierten Biomoleküle wie ihre natürlichen Analoga verhalten und entsprechend metabolisiert werden können.^[33,34] All diese Faktoren tragen dazu bei, dass die Azidgruppe bis heute die bedeutendste Reportermodifikation für bioorthogonale Reaktionen darstellt.^[35]

Die 1919 von Hermann Staudinger beschriebene milde Reduktion von organischen Aziden mit Triphenylphosphan und Wasser zu Aminen lieferte die Grundlage für die von Bertozzi *et al.* entwickelte Staudinger-Ligation.^[36,37] Durch die Einführung einer Methylestergruppe in *ortho*-Position zum Phosphoratom am Aromaten reagiert die Azaylid-Zwischenstufe intramolekular weiter zu einem stabilen Amidprodukt.^[24] Diese modifizierte Version der prototypischen Staudinger-Reduktion erlaubt u. a. die selektive Konjugation von azidfunktionalisierten Glykanen in Zelllysaten, lebenden Zellen und Mäusen.^[24,36,38-40] Auch wenn beide Reaktionspartner nicht toxisch für natürliche Systeme sind und sich somit gut für bioorthogonale Reaktionen eignen, bleibt der aromatische Rest und das Phosphanoxidmotiv im Konjugationsprodukt erhalten. Dies kann bei bestimmten Biomolekülen zu einer starken Änderung der nativen Eigenschaften führen.

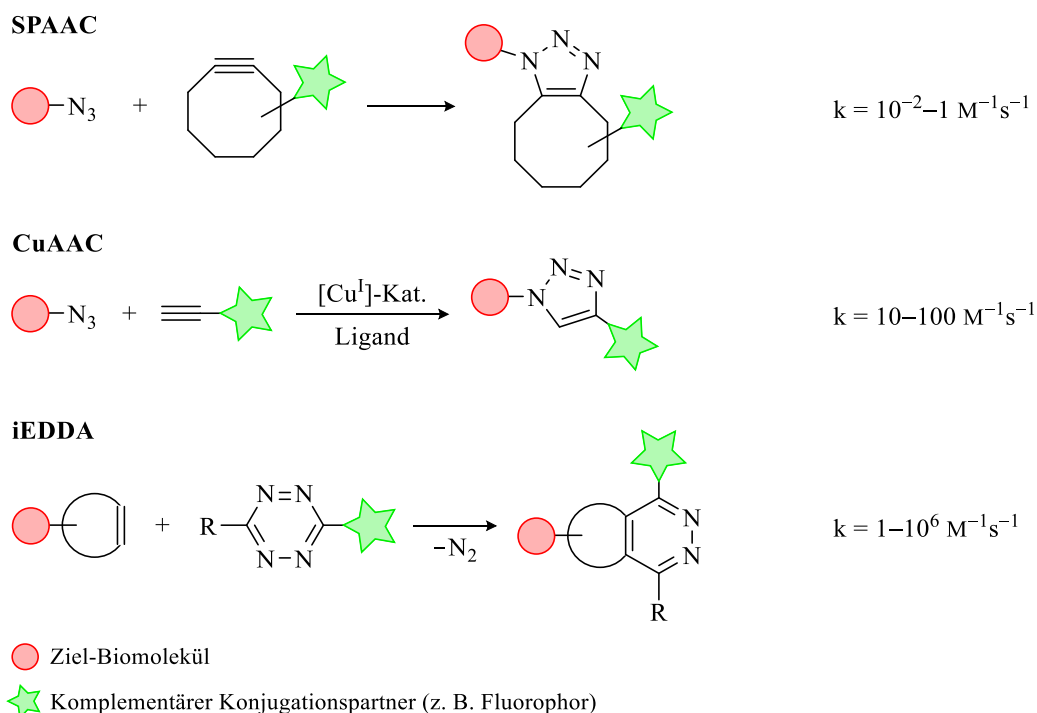
Kurze Zeit nach der Veröffentlichung der klassischen Staudinger-Ligation wurde im Jahr 2000 von Bertozzi *et al.* und Raines *et al.* eine spurlose Variante der Reaktion für die Peptidsynthese vorgestellt.^[41,42] Bei der spurlosen Staudinger-Ligation wird unter Abspaltung der aromatischen Phosphanoxideinheit eine Amidbindung zwischen beiden zu konjugierenden Resten gebildet. Hierfür werden acylierte Phosphane, meist Thioester, eingesetzt.^[43] Die Konjugationsmethode der Staudinger-Ligation findet bis heute eine vielfältige Anwendung in komplexen biologischen Systemen, z. B. bei der Markierung von Glykanen, Lipiden, DNA und Proteinen.^[43,44] Aufgrund ihrer geringen Reaktionsgeschwindigkeit ($k = 10^{-4} - 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und der möglichen Oxidation der Phosphanverbindung durch Luftsauerstoff oder metabolisierende Enzyme, ist die Staudinger-Ligation alternativen Konjugationsmethoden *in vivo* unterlegen.^[24,27,45]

Wesentlich höhere Selektivitäten und Geschwindigkeiten werden durch bestimmte Reaktionen erreicht, die dem Prinzip der sogenannten „Click-Chemie“ folgen. Click-Reaktionen müssen nach dem 2001 von Sharpless *et al.* vorgestellten Konzept strenge Kriterien erfüllen.^[46] Darunter fallen Modularität, breite Anwendbarkeit, sehr hohe Ausbeuten, einfache Reaktionsbedingungen, Einsatz leicht verfügbarer Reagenzien und die Bildung nicht störender Neben-

produkte, die sich durch nicht-chromatographische Methoden abtrennen lassen. Zusätzlich müssen Click-Reaktionen stereospezifisch, aber nicht zwingend enantioselektiv, und mit hoher Atomeffizienz ablaufen. Idealerweise sind die Reaktionen gegenüber Wasser und Luftsauerstoff unempfindlich und zeichnen sich durch die Verwendung von keinen, unschädlichen oder leicht entfernbaren Lösungsmitteln aus. Weitere Anforderungen sind eine einfache Produktisolierung und die Produktstabilität unter physiologischen Bedingungen.^[46] Der Natur nachempfunden, soll durch schnelle, selektive und vollständige Reaktion kleinerer Moleküle nach Art eines Baukastenprinzips eine große Anzahl an Verbindungen mit Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungen und hoher Strukturvielfalt erhalten werden. Beispiele für Click-Reaktionen sind nukleophile Substitutionen wie Ringöffnungsreaktionen von Epoxiden und Aziridinen, Additionen an C-C-Mehrfachbindungen wie Epoxidierung und Dihydroxylierung und Cycloadditionen ungesättigter Verbindungen.^[46]

Das große Potential der „Click-Chemie“ wird seit ihrer Begriffseinführung von Sharpless *et al.* in vielen Bereichen der Chemie, Materialwissenschaften, Pharmazie und Biologie genutzt.^[47] Aufgrund der hohen Selektivität und der möglichen Durchführung unter physiologischen Bedingungen gewinnen bekannte und weiterentwickelte Click-Reaktionen bei der bioorthogonalen Markierung von Biomolekülen in zellulären Systemen stetig an Popularität.^[48]

Eine Auswahl an Cycloadditionen, die die meisten Kriterien der Click-Chemie erfüllen und für die spezifische Konjugation von Biomolekülen verwendet werden, ist in Schema 1 nach steigender Reaktionsgeschwindigkeit dargestellt.^[49] Die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), die spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) und die Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) – die für diese Doktorarbeit relevanten Reaktionstypen – werden in nachfolgenden Kapiteln detaillierter beschrieben.

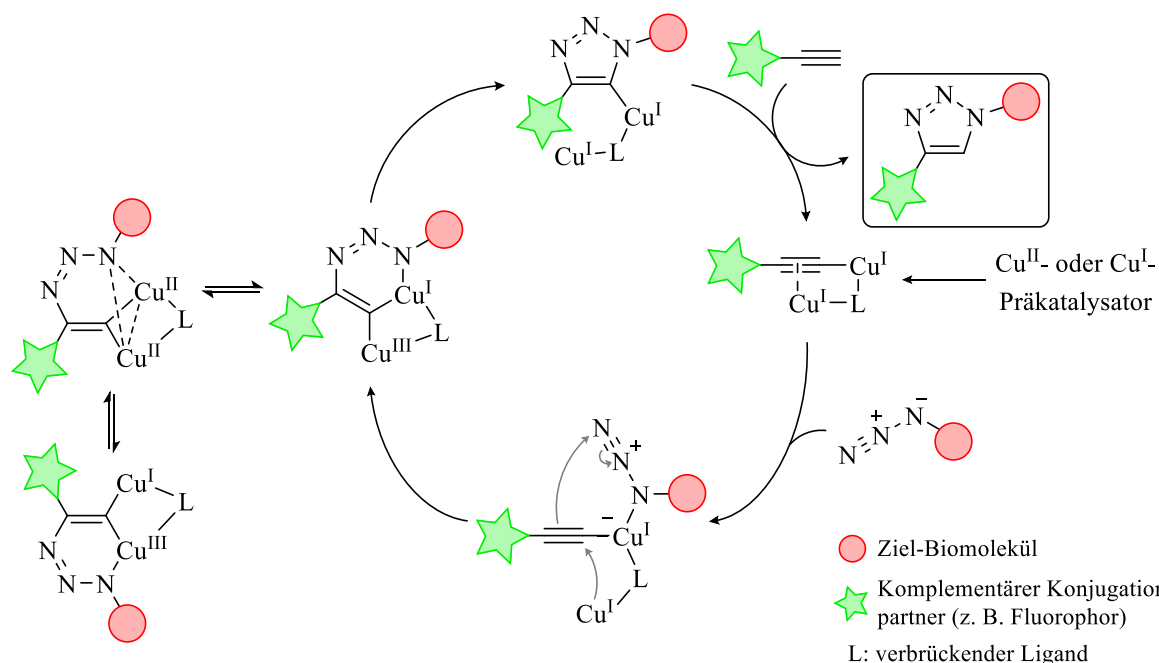


Schema 1: Beispiele für bioorthogonale Click-Reaktionen, die bei der Markierung von Biomolekülen durch Konjugation mit z. B. einem Fluorophor eingesetzt werden können (k : Geschwindigkeitskonstante).^[49]

2.1.1 Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)

Die bekannteste und am häufigsten durchgeführte Click-Reaktion ist die kupferkatalysierte [3+2]-Cycloaddition zwischen einem Azid als 1,3-Dipol und einem terminalen Alkin. Während die in den 1960er Jahren von Rolf Huisgen beschriebene unkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition hohe Temperaturen und lange Reaktionszeiten benötigt, verläuft die von Meldal *et al.* und Sharpless *et al.* parallel entwickelte Version durch den Einsatz katalytischer Mengen einer Cu(I)-Spezies schnell und unter milden Reaktionsbedingungen ab.^[50-53] Ein weiterer Vorteil der CuAAC gegenüber der unkatalysierten Variante, bei der ein Produktgemisch aus 1,4- und 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazolen entsteht, ist die selektive Bildung des 1,4-Regioisomers.^[54]

Der Katalysezyklus der CuAAC ist im nachfolgenden Schema 2 dargestellt.

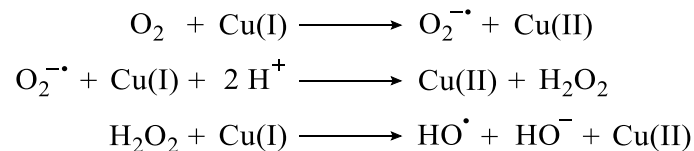


Schema 2: Postulierter Reaktionsmechanismus der CuAAC eines terminalen Alkins mit einem organischen Azid zu einem 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazol.^[55]

Im ersten Schritt der Reaktion wird ein Acetylid gebildet, welches eine σ - und eine π -Bindung zu jeweils einem Kupfer(I)-Atom aufweist. Die Anlagerung des Azids, deren genaue Art noch nicht vollständig aufgeklärt ist, führt zur Ausbildung eines ternären Azid-Alkin-Kupfer(I)-Komplexes, der daraufhin unter Oxidation eines Kupferatoms eine sechsgliedrige Metallacyclus-Spezies generiert.^[55,56] Fokin *et al.* konnten durch die gezielte Isotopenmarkierung mit einem ⁶³Cu-angereicherten Katalysator erstmals zeigen, dass beide Kupferzentren einem sehr schnellen internen Umlagerungsgleichgewicht (*Scrambling*) unterliegen und somit insgesamt zwei chemisch äquivalente Kupferatome gemeinsam bei der Bildung des [2+3]-Cycloadditionsprodukts beteiligt sind.^[57] Nach der reduktiven Ringkontraktion zu einem Kupfer(I)-Triazolid wird ein weiteres Alkin deprotoniert und der Katalysezyklus unter Abspaltung des gewünschten 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols geschlossen (Schema 2).^[55]

Als Katalysatoren können Cu(I)-Salze wie Kupferiodid direkt eingesetzt werden. Jedoch stellte sich heraus, dass die *in situ*-Generierung der katalytisch aktiven Cu(I)-Spezies ausgehend von Cu(II)-Salzen wie Kupfersulfat mit Reduktionsmitteln besonders vorteilhaft ist, da bei dieser Variante in wässrigem Medium der Einsatz von zusätzlichen organischen Lösungsmitteln oder Stickstoffbasen wegfällt. Zusätzlich wird die Bildung von Nebenprodukten wie 5-Hydroxytriazole und Diene minimiert. Weitere Vorteile von Cu(II)-Salzen sind deren geringere Kosten und höhere Reinheit im Vergleich zu Cu(I)-Salzen. Ein besonders geeignetes Reduktionsmittel der Cu(II)-Spezies stellt das kostengünstige und wasserlösliche Natriumascorbat dar.^[53]

Der relevanteste Nachteil der CuAAC, der den Einsatz in lebenden biologischen Systemen stark einschränkt, ist die mögliche Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei Anwesenheit von Luft und katalytisch aktiven Kupfer(I)-Ionen (Schema 3). Wasserstoffperoxid, hoch reaktive Hydroxyradikale und Superoxidradikalanionen verursachen oxidativen Stress und schädigen Biomoleküle wie DNA, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate, sodass unter anderem ROS für die Zytotoxizität von Kupferionen verantwortlich gemacht werden.^[54,56,58]



Schema 3: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) während der CuAAC.^[56]

Durch den Einsatz von chelatisierenden Liganden, die mit den aktiven Kupfer(I)-Ionen biokompatible Komplexe ausbilden, wird die Oxidationsstufe +1 stabilisiert. Dies hat zur Folge, dass wesentlich geringere Katalysatormengen im ppm-Bereich nötig sind, die Reaktionszeit auf wenige Minuten stark verkürzt und die Bildung toxischer ROS verhindert wird. Dadurch wird die bioorthogonale Konjugation von Biomolekülen mittels CuAAC auch in lebenden Zellen ermöglicht.^[54,58] Breite Anwendung *in vivo* finden v. a. Stickstoffliganden wie THPTA und BTAA, die ein Tris(triazolmethyl)amin-Grundmotiv aufweisen und im Gegensatz zu den unpolaren Vorgängern der ersten Ligandengeneration wasserlöslich sind (Abbildung 2).^[58-60]

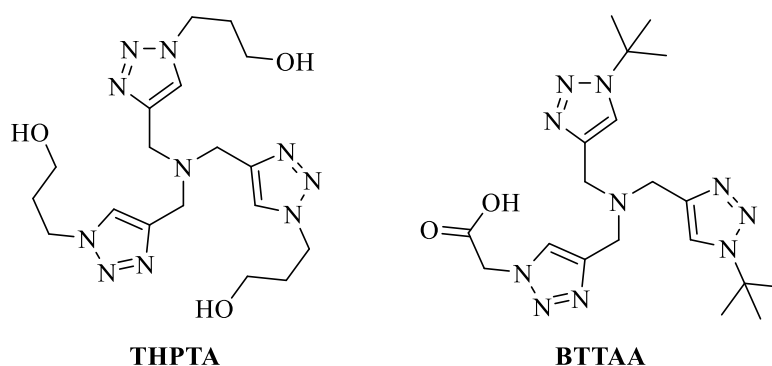


Abbildung 2: Beispiele für bekannte Chelatliganden auf Basis eines Tris(triazolmethyl)amins, die durch Cu(I)-Stabilisierung die CuAAC *in vivo* ermöglichen.^[54]

Eine alternative Methode der bioorthogonalen Konjugation von azidfunktionalisierten Biomolekülen ist die Reaktion mit gespannten Alkinen, bei der kein Kupferkatalysator nötig ist.

2.1.2 Spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC)

Wird eine C-C-Dreifachbindung in ein cyclisches Molekül integriert, weichen die Bindungswinkel der sp-hybridisierten Kohlenstoffatome stark von den bevorzugten 180° ab. Durch die aufgebaute Ringspannung kommt es zur Erhöhung der Reaktivität bezüglich Additionen mit 1,3-Dipolen wie organischen Aziden, sodass keine zusätzlichen Metallkatalysatoren eingesetzt werden müssen. Die Ringspannung liegt in Cyclooctin, dem kleinsten stabilen (d. h. bei Raumtemperatur isolierbaren) Cycloalkin, mit Bindungswinkeln von 163° bei ca. $80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.^[61,62] Ein Großteil dieser Ringspannung wird bei der [3+2]-Cycloaddition mit Aziden abgebaut, was die Triebkraft der Reaktion darstellt. Die historische Grundlage der kupferfreien, spannungsinduzierten Azid-Alkin-Cycloaddition (*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC) geht auf Blomquist *et al.* zurück, die 1953 von einer „explosionsartigen“ Reaktion zwischen Cyclooctin und Phenylazid berichteten.^[63] Dass dabei ein 1,2,3-Triazol als Cycloadditionsprodukt erhalten wird, wurde acht Jahre später von Wittig *et al.* aufgeklärt.^[64] Motiviert von diesen Vorarbeiten nutzten Bertozzi *et al.* 2004 erstmals ein Cyclooctin-Derivat (OCT) für eine kupferfreie Click-Reaktion mit azidmodifizierten Glykanen *in vitro* und in lebenden Zellen.^[61] Im Gegensatz zur CuAAC, bei der Kupferintermediate gebildet werden, handelt es sich bei der SPAAC um eine konzertierte [3+2]-Cycloaddition, bei der zwei Regioisomere entstehen. Des Weiteren ist die Reaktionsgeschwindigkeit der OCT-Sonden um etwa drei Größenordnungen geringer als die der CuAAC und liegt somit im Bereich der Staudinger-Ligation.^[24,25,65]

Da eine schnelle bioorthogonale Reaktion entscheidend für Anwendungen *in vivo* ist, wurden in den letzten zwei Jahrzehnten verschiedene reaktive Cyclooctine entwickelt (Abbildung 3).

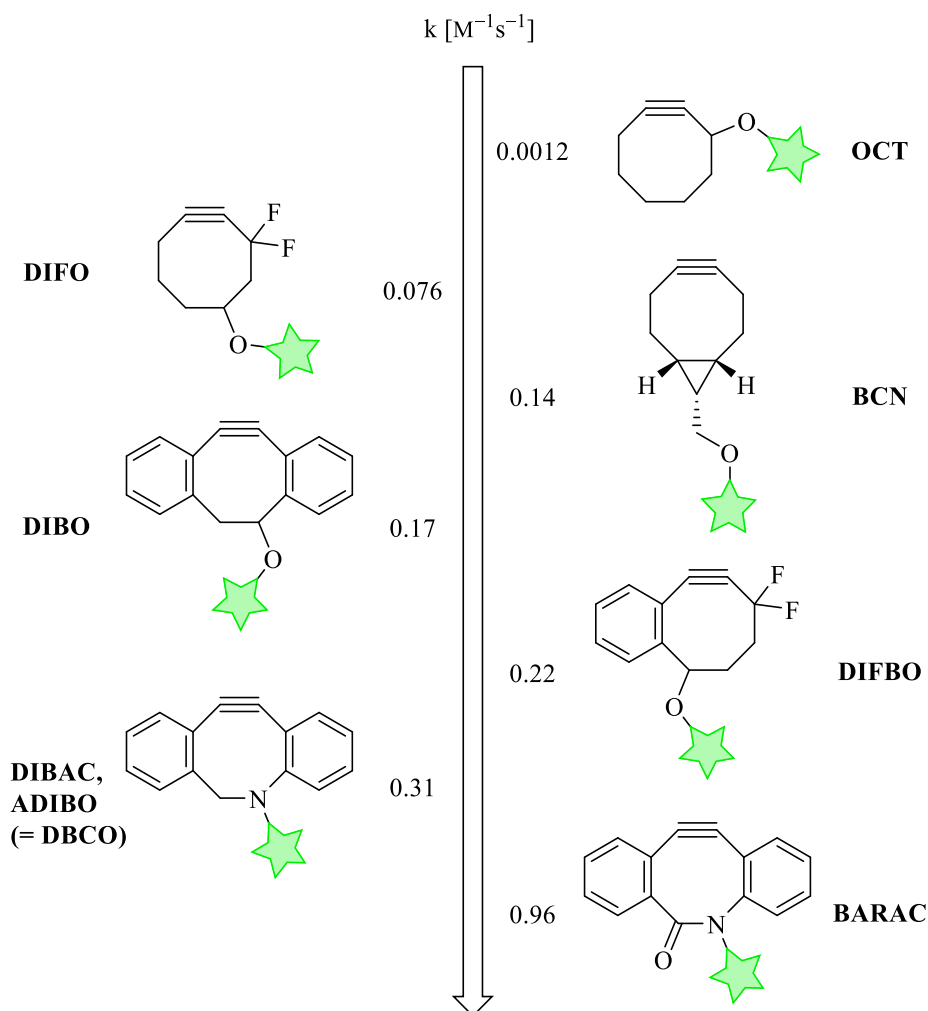


Abbildung 3: Übersicht einer Auswahl an gespannten Cyclooctinen für die SPAAC und deren Entwicklung in Richtung steigender Reaktionsgeschwindigkeit (k : Geschwindigkeitskonstante).^[66]

Die Reaktivität des Dipolarophils gegenüber einem Azid kann, wie bei dem difluorierten Cyclooctinderivat DIFO, durch elektronenziehende Substituenten in Propargylstellung erhöht werden (Abbildung 3).^[67] Grund dafür ist die energetische Absenkung des niedrigsten unbesetzten Molekülorbitals (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) des Alkins, sodass die Energiedifferenz zum höchsten besetzten Molekülorbital (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) des 1,3-Dipols verringert wird. Die Stabilisierung des LUMOS senkt die Aktivierungsenergie der [3+2]-Cycloaddition und führt dadurch zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit.^[67,68] Als stark elektronenziehende Substituenten eignen sich vor allem Fluoratome, da diese klein sind und die C-F-Bindung sehr stabil und chemisch inert ist.^[69,70]

Ein weiterer Ansatz zur Steigerung der Reaktionskinetik ist die Erhöhung der Ringspannung. Dies wird bei den Dibenzocyclooctin-Derivaten (DIBO) durch Anellierung von Aromaten und die Einführung mehrerer sp^2 -hybridisierter C-Atome im Cyclooctingerüst erreicht.^[71]

Bei Bicyclononin (BCN), das im Gegensatz zu den anderen vorgestellten Cyclooctinderivaten zu keinem Regioisomerenmisch nach der Cycloaddition führt, wird die Reaktivität durch Anellierung von Cyclopropan erhöht.^[72] Bei Difluorbenzocyclooctin (DIFBO) werden beide Methoden zur Reaktivitätssteigerung (LUMO-Stabilisierung durch elektronenziehende Reste und Erhöhung der Ringspannung) kombiniert (Abbildung 3).

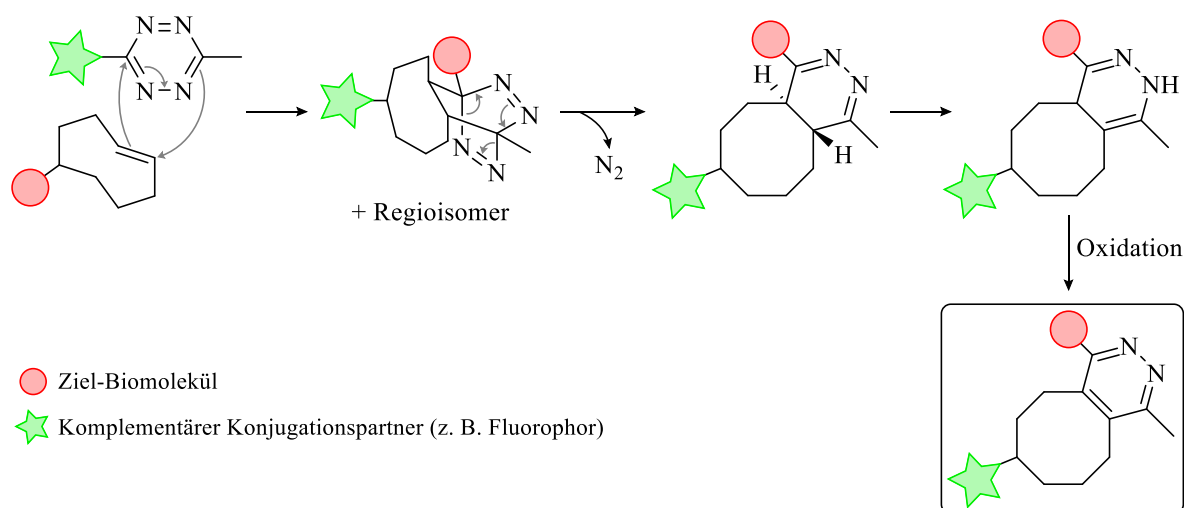
Unabhängig voneinander entwickelten Van Delft *et al.* und Popik *et al.* Cyclooctinderivate mit exocyclischen Amidbindungen, die neben den aromatischen Einheiten zu einer Erhöhung der Ringspannung führen.^[73,74] Die entsprechenden Dibenzoazacyclooctine (DIBAC) bzw. Azadibenzocyclooctine (ADIBO) gehören zu den am häufigsten genutzten Cyclooctinderivaten für bioorthogonale Konjugationen mittels SPAAC – sowohl *in vitro* als auch *in vivo* –, da sie hohe Reaktivitäten mit gleichzeitiger Stabilität aufweisen und synthetisch gut zugänglich sind. Als Synonym für DIBAC und ADIBO wird oft der Begriff Dibenzocyclooctin (DBCO) verwendet (Abbildung 3).^[62] Eine große Anzahl an DBCO-funktionalisierten Biomolekülen (Reporter) und Fluorophoren (Sonden) sowie für die DBCO-Modifizierung geeignete Reagenzien sind für gezielte Studien komplexer biologischer Systeme bereits kommerziell erhältlich.

Bertozzi *et al.* entwickelten 2010 ein Biarylazacyclooctin-Derivat (BARAC), ein Lactam, bei dem kein sp^3 -hybridisiertes C-Atom mehr im Cyclooctingerüst vorhanden ist (Abbildung 3). BARAC, das an Fluorescein gebunden ist, konnte durch Konjugation an azidfunktionalisierte Glykane für die fluoreszenzmikroskopische Bildgebung lebender Jurkat-Zellen verwendet werden. Dabei wurden selbst bei nanomolaren Konzentrationen des Cyclooctins hohe Signal-zu-Rausch-Verhältnisse erreicht, sodass keine zusätzlichen Waschschrte nötig waren. Auch wenn mit BARAC hohe Geschwindigkeitskonstanten von etwa $1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erreicht werden, sind die Einsatzmöglichkeiten aufgrund der geringen Stabilität *in vivo* beschränkt. Nach Bertozzi *et al.* sollten BARAC-Verbindungen möglichst als Feststoff bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie unter Licht- und Sauerstoffausschluss gelagert werden.^[75]

Die zu den Click-Reaktionen zählende SPAAC gehört heutzutage bei Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* zu den beliebten und häufig eingesetzten Markierungsmethoden, da sie ohne Einsatz toxischer Katalysatoren die spezifische Konjugation von Biomolekülen unter wässrigen bzw. physiologischen Bedingungen ermöglicht.^[76] Eine alternative Variante bioorthogonaler Cycloadditionen, die ebenfalls auf dem Prinzip des Ringspannungsabbaus beruht, ist die iEDDA.

2.1.3 Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA)

Unter den bisher entwickelten bioorthogonalen Click-Reaktionen weist die Konjugation eines Tetrazins mit einem gespannten Dienophil die mit Abstand höchste Geschwindigkeit auf. Die unter dem Begriff Diels-Alder-Reaktion ([4+2]-Cycloaddition) mit inversem Elektronenbedarf (*inverse electron-demand Diels-Alder reaction*, iEDDA) fallende Tetrazin-Ligation beschreibt die Reaktion eines Diens (1,2,4,5-Tetrazin) mit einem Dienophil (z. B. Alken). Im Gegensatz zur normalen Diels-Alder-Reaktion, bei der ein elektronenreiches Dien mit einem elektronenarmen Dienophil reagiert, kommt es bei der iEDDA zu einer [4+2]-Cycloaddition zwischen einem elektronenreichen Dienophil und einem elektronendefizienten Dien. Dabei wird ein hochgespanntes bicyclisches Intermediat gebildet, das in einer nachfolgenden Retro-Diels-Alder-Reaktion ein Äquivalent elementaren Stickstoffs freisetzt. Das erhaltene 4,5-Dihydropyridazin unterliegt einer Isomerisierung zur 1,4-Dihydropyridazin-Spezies, die letztlich unter Rearomatisierung zum Pyridazin-Produkt oxidiert werden kann (Schema 4).^[49]



Schema 4: Reaktionsmechanismus der iEDDA am Beispiel eines elektronendefizienten Methyltetrazins und eines *trans*-Cyclooctens (TCO).^[49]

Bei der Konjugation über iEDDA wird wie bei der SPAAC ein Produktgemisch aus zwei Regioisomeren erhalten. Sowohl der Abbau der Ringspannung bei gespannten Alkenen wie *trans*-Cycloocten (TCO)-Derivaten als auch die irreversible Freisetzung von gasförmigem Stickstoff sind die starken Triebkräfte dieser sehr effizienten Click-Reaktion. So werden bei der iEDDA äußerst hohe Geschwindigkeitskonstanten von $1-10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erreicht, die etwa um den Faktor 10^5 höher als die der CuAAC und um den Faktor 10^8 höher als die der SPAAC sind.^[49]

Die Reaktionsrate wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Durch die geschickte Wahl der Substituenten an Tetrazin und Alken kann die Energiedifferenz zwischen LUMO des Diens und HOMO des Dienophils – und somit auch die Kinetik der iEDDA – verändert werden. Die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit durch elektronische Effekte der Substituenten wurde in Arbeiten von Sauer *et al.* ausführlich untersucht.^[77] Elektronenziehende Gruppen am Dien führen zur Absenkung der LUMO-Energie, während elektronenschiebende Reste am Dienophil die HOMO-Energie anheben. Beide Effekte haben eine schnellere Reaktion zur Folge. Neben elektronischen Effekten spielt auch die Ringspannung des Dienophils eine wichtige Rolle bei der Reaktionskinetik: diese nimmt mit steigender Ringspannung zu.^[49] Obwohl Cyclooctene eine geringere Ringspannung als Cyclopropene besitzen, läuft die iEDDA mit *trans*-Cycloocten (TCO) wesentlich schneller ab. Dies ist auf die kronenförmige Konformation des TCO zurückzuführen, die (auch im Vergleich zur Halbsesselstruktur des *cis*-Cyclooctens) deutlich weniger Deformationsenergie für die Reaktion mit einem Dien benötigt.^[49,78,79] Bei TCO-Derivaten wird die Reaktionsrate zusätzlich durch die Stereochemie beeinflusst (axiale *versus* äquatoriale Substituenten).^[80-82] Des Weiteren reagieren sterisch weniger anspruchsvolle Tetrazine und Dienophile schneller miteinander.^[49] Außerdem wird die iEDDA in polaren Lösungsmitteln, v. a. in Wasser, beschleunigt. Dieser Effekt wird auf die stabilisierte Wechselwirkung zwischen aktivierten Komplexen und dem Lösungsmittel sowie auf eine verstärkte Interaktion der hydrophoben Reaktionspartner zurückgeführt.^[49,83]

Die iEDDA weist bis *dato* die größten Geschwindigkeitskonstanten von bioorthogonalen Click-Reaktionen auf, jedoch besteht ein Nachteil darin, dass beide Konjugationspartner (TCO und Tetrazin) sterisch anspruchsvoller sind als einfache Azide oder Alkine. Dies kann zur Änderung der intrinsischen Eigenschaften der Ziel-Biomoleküle führen und somit die Anwendung der iEDDA einschränken. Daher sollten die Eigenschaften von Click-Reaktionen stets sorgfältig abgewogen und die am besten geeignete Reaktion entsprechend ihrem Zweck bzw. der zugrundeliegenden biologischen Fragestellung ausgewählt werden.^[76] Da mittels iEDDA Konjugationen mit sehr geringen Konzentrationen an modifizierten Biomolekülen (vergleichbar mit Konzentrationen intrazellulärer Proteine) unter milden Bedingungen im wässrigen Milieu mit hoher Selektivität möglich sind, eignet sich diese bioorthogonale Click-Reaktion bestens für *in vivo*-Studien zu zellulären Funktionen und dynamischen Zellprozessen.^[13,26,49,76,84]

Mit der Synthese eines TCO-modifizierten Ceramidderivats wurde 2014 das iEDDA-Prinzip für die Konjugation in lebenden Zellen von Erdmann *et al.* erstmals auf die Verbindungsklasse der bioaktiven Sphingolipide übertragen.^[85]

2.2 Sphingolipide

Neben Glycerophospholipiden und Cholesterol gehören Sphingolipide zu den Hauptbestandteilen eukaryotischer Zellmembranen. Ihren Namen verdanken sie dem deutschen Arzt und Biochemiker Johann L. W. Thudichum, der 1884 zum ersten Mal Sphingolipide aus humanem Hirngewebe isolierte.^[86] Wie die Anlehnung an die mystische Sphinx verdeutlicht, stellte die Aufklärung der Struktur und Funktion dieser Lipidklasse den Entdecker noch vor große Rätsel. Heute ist bekannt, dass Sphingolipide nicht nur strukturgebende Funktionen zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität erfüllen, sondern auch als bioaktive Signalmoleküle bei vielen physiologischen Prozessen wie Zellwachstum, -überleben und -tod beteiligt sind.^[22,87] Sphingolipide kommen in allen Eukaryoten (Tiere, Pflanzen und Pilze) sowie in manchen Bakterien und Viren vor.^[88-90] Im Jahr 2015 waren bereits über 4300 strukturell unterschiedliche Verbindungen dieser Lipidklasse datenbanklich erfasst.^[91]

2.2.1 Aufbau der Sphingolipide

Das Grundgerüst der Sphingolipide bildet ein langkettiger Aminoalkohol, auch Sphingoidbase oder *long-chain base* (LCB) genannt. In Säugetieren ist dies hauptsächlich das C₁₈-Rückgrat Sphingosin (**1**), das bei komplexen Sphingolipiden über eine Amidbindung mit Carbonsäuren verknüpft ist (Abbildung 4). Ceramide stellen mit einem Wasserstoffatom als Kopfgruppe die einfachsten *N*-acylierten Sphingolipide dar. Neben dem Fettsäurerest kann bei Sphingolipiden auch die Kopfgruppe variieren und mit z. B. Phosphat-, Phosphocholin- oder verschiedenen Kohlenhydrateinheiten modifiziert sein.^[92,93]

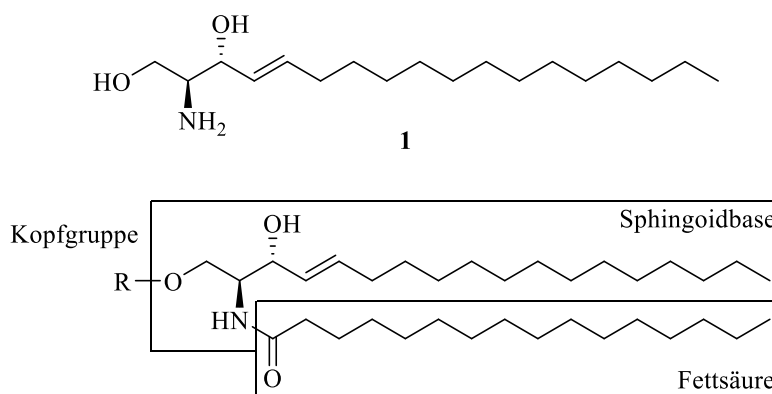


Abbildung 4: Strukturen von Sphingosin (**1**) und daraus abgeleiteten komplexen Sphingolipiden mit *N*-acylierter Palmitinsäureseitenkette und der variablen Kopfgruppe R.

Die zahlreichen Modifikationsmöglichkeiten der Sphingoidbasen, Fettsäureresten und Kopfgruppen führen zu einer enorm großen strukturellen Vielfalt. Dabei ist die Struktur und der Gehalt der Sphingolipide stark art-, gewebe- und zellabhängig.

In Säugetieren sind vor allem Sphingoidbasen mit 18 Kohlenstoffatomen vorhanden. Neben Sphingosin sind hier Sphinganin (gesättigtes Sphingosin ohne C-C-Doppelbindung, Dihydro-sphingosin) und Phytosphingosin (Sphinganin mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe an C-4) die häufigsten Vertreter.^[92] In humanem Hirn und Plasma ist zudem ein Sphingosinderivat mit einer weiteren Z-konfigurierten C-C-Doppelbindung an Position 14 zu finden, während im Hautgewebe 6-Hydroxysphingosin vorkommt.^[92,94] Andere Sphingoidbasen mit Kettenlängen zwischen 12 und 26 Kohlenstoffatomen wurden, wenn auch nur in geringen Mengen, ebenfalls in Säugetieren nachgewiesen.^[95,96] Am Kettenende verzweigte Sphingoidbasen mit *iso*- und *anteiso*-Konfiguration wurden beispielsweise in gramnegativen, obligat anaeroben Bakterien und in Rindermilch sowie -nieren gefunden.^[89,97]

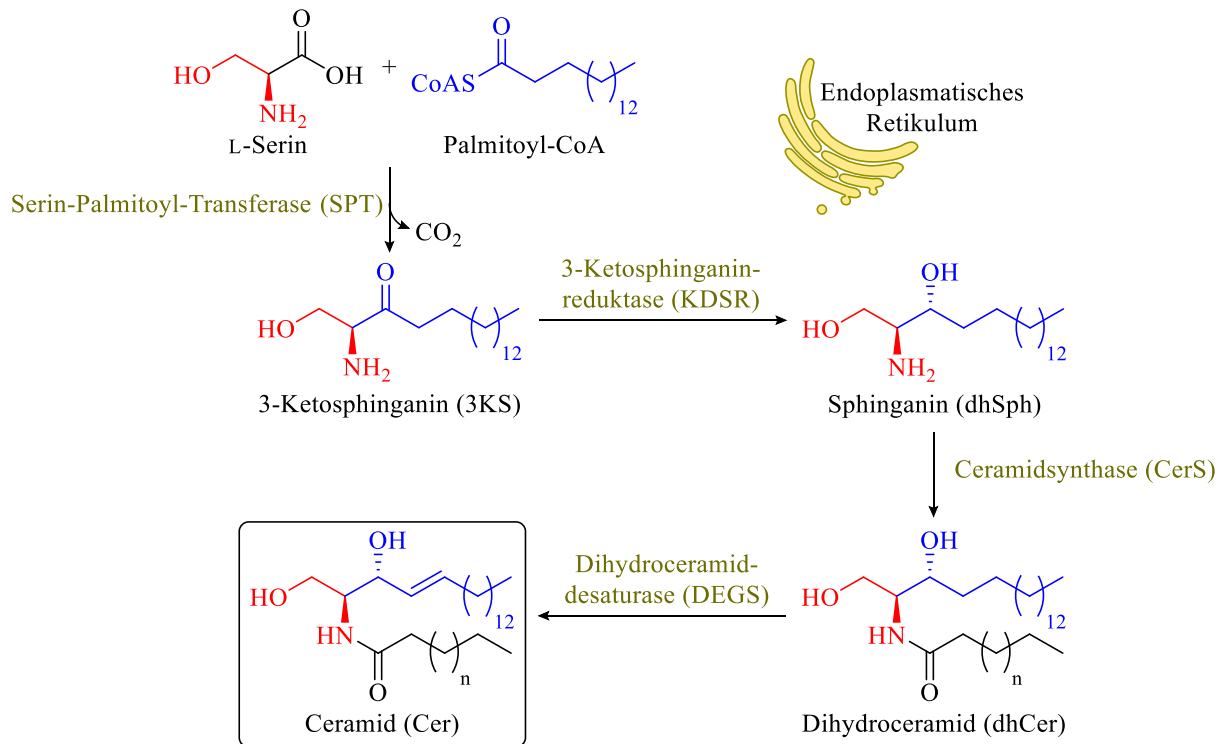
Neben den Sphingoidbasen variieren bei Ceramiden in Säugetieren ebenfalls die *N*-acylierten Fettsäuren hinsichtlich Kettenlänge, Sättigungsgrad und Substituenten. Es überwiegen Carbonsäuren mit einer Länge zwischen 14 und 36 C-Atomen, wobei diese meist gesättigt sind oder eine C-C-Doppelbindung bzw. eine α -Hydroxyfunktion aufweisen.^[98] In humanem Plasma wurden von Quehenberger *et al.* insgesamt 204 Sphingolipidspezies nachgewiesen, was etwa 4 % aller Plasmalipide ausmacht. Davon sind wiederum nur knapp 4 % reine Ceramide, also *N*-acylierte Sphingolipide ohne gebundene Kopfgruppe (R = H, Abbildung 4).^[99] Ein außergewöhnlich hoher Ceramidgehalt von etwa 50 % aller vorhandenen Lipide ist dagegen im *Stratum corneum*, der obersten Schicht der menschlichen Epidermis zu finden.^[100] In dieser Hautschicht sind Ceramide vertreten, deren Fettsäurekette zwischen 16 und 32 (bevorzugt 24 und 26) C-Atome lang sind. Zusätzlich kommen in der Haut *O*-acylierte Ceramidspezies mit ultralangkettigen Carbonsäureresten von 30 bis 34 Kohlenstoffatomen vor, die über eine ω -Hydroxygruppe mit (9Z,12Z)-Octadeca-9,12-diensäure, auch Linolsäure genannt, verestert sind.^[100-102] Die hydrophoben, interzellulären Lipidschichten des *Stratum corneum* verhindern zum einen die Diffusion von Wasser, also das Austrocknen der Haut, und zum anderen das Eindringen von Mikroorganismen.^[103] Ceramide mit sehr kurzkettigen Acetylresten (C₂-Fettsäure) wurden im Gehirn- und Lebergewebe von Mäusen gefunden, jedoch in Konzentrationen, die um etwa den Faktor 5000 geringer sind als die der hauptsächlich vorkommenden langkettigen Ceramide.^[104]

Die Variation der Kopfgruppe über die primäre Hydroxygruppe an C-1 führt ebenfalls zur strukturellen Vielfalt der Sphingolipide, die sich in ihren unterschiedlichen biologischen Eigenschaften und Funktionen widerspiegelt. Die einfachste polare Kopfgruppe ist ein Phosphat, das beispielweise bei dem Signalmolekül Sphingosin-1-phosphat (S1P) oder Ceramid-1-phosphat vorkommt.^[98] Der häufigste Vertreter aller Sphingolipide in Säugetieren stellt Sphingomyelin (SM) mit Phosphocholin als Kopfgruppe dar. SM-Spezies befinden sich in den meisten Zellen und Geweben, vor allem jedoch in der lipidreichen Myelinscheide, die die Axone der Nervenzellen umgibt.^[105] Im Menschen machen Sphingomyeline fast 85 % aller Sphingolipide und 10 bis 20 Molprozent der gesamten Plasmamembranlipide aus, wobei sie bevorzugt in den äußeren Schichten der Lipiddoppelmembran lokalisiert sind.^[106] Neben Sphingomyelin spielen auch Glycosphingolipide eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Myelinstruktur und -funktion. Diese Sphingolipidklasse beinhaltet *N*-acylierte Sphingoidbasen (Ceramide), deren Kopfgruppe aus unterschiedlichen Saccharideinheiten besteht. Dabei ist die primäre Hydroxygruppe der Sphingoidbase über eine β -glycosidische Bindung mit einem Kohlenhydratrest verknüpft. In höher entwickelten Tieren ist dies typischerweise eine Galactose- oder Glucoseeinheit, die darüber hinaus mit Sulfatgruppen oder weiteren Sacchariden unterschiedlich modifiziert sein kann. Letzteres führt aufgrund verschiedener glycosidischer Verknüpfungsmöglichkeiten zu den komplexesten Sphingolipiden.^[107] In Wirbeltieren wurden bereits über 400 verschiedene Glycosphingolipide, deren Glycanstrukturen mit ein bis 20 Kohlenhydrat-einheiten an Ceramide gebunden sind, nachgewiesen.^[108]

Auch wenn in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Strukturen und biologische Funktionen bestimmter Sphingolipide aufgeklärt wurden, sind die zugrundeliegenden mechanistischen Details bei vielen zellulären Prozessen wie Signalkaskaden noch unbekannt. Um neue Ansätze für die Prävention oder Behandlung von verschiedenen Krankheiten entwickeln zu können, ist ein umfassendes Verständnis der bislang nicht vollständig aufgeklärten, hochkomplexen und miteinander verknüpften Sphingolipidstoffwechselwege von großem medizinischen Interesse.

2.2.2 Biosynthese und Metabolismus der Sphingolipide

Die zentrale Verbindung des Sphingolipidmetabolismus stellt Ceramid dar, dessen *de novo*-Biosynthese auf der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) stattfindet und vier enzymatische Schritte beinhaltet.^[109,110] Die *de novo*-Synthese von palmitinsäureabgeleiteten Ceramiden mit Sphingosingrundgerüst ist im nachfolgenden Schema 5 dargestellt.



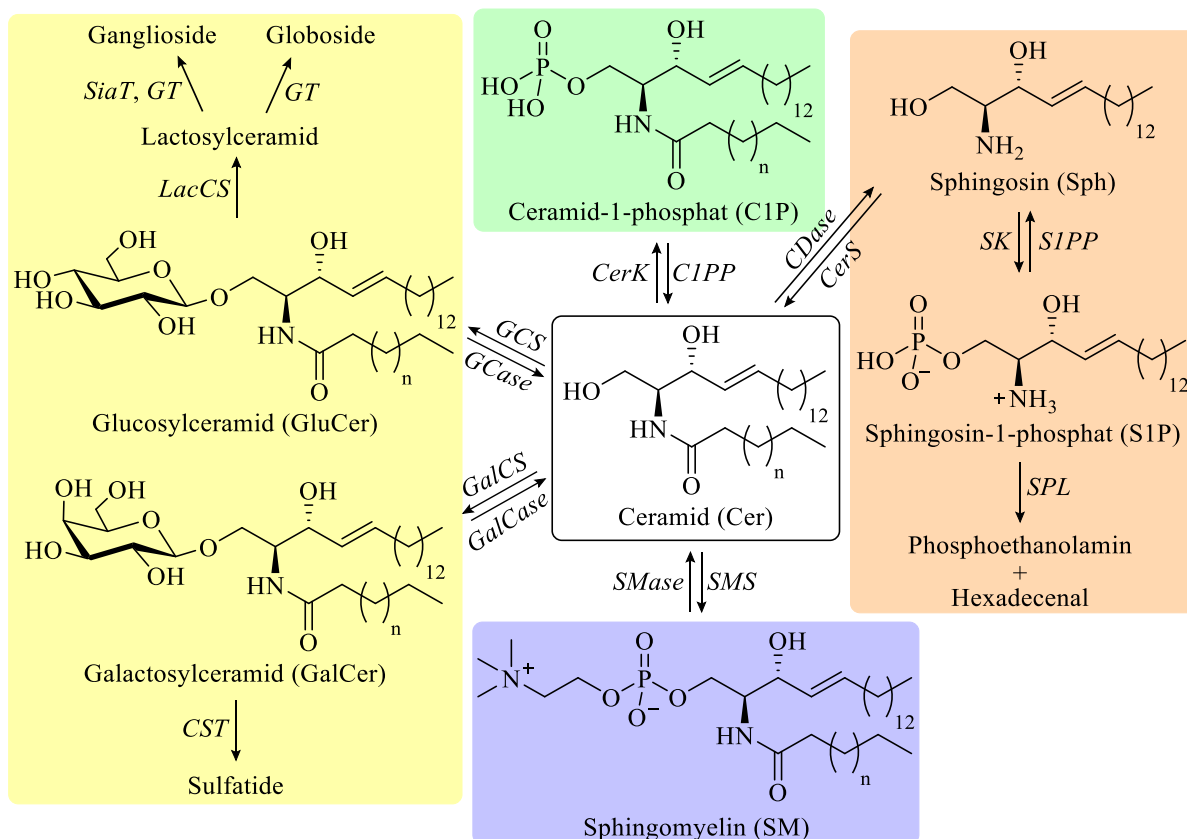
Schema 5: Übersicht der im endoplasmatischen Retikulum stattfindenden *de novo*-Biosynthese von Ceramid als zentrale Verbindung des Sphingolipidmetabolismus mit Angabe der beteiligten Enzyme.^[109]

Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der *de novo*-Sphingolipidsynthese ist die Claisen-ähnliche Kondensation der proteinogenen, nicht-essentiellen Aminosäure L-Serin mit der aktivierten C₁₆-Fettsäure Palmitoyl-Coenzym A (Palmitoyl-CoA) zu 3-Ketosphinganine (3KS) (Schema 5). Diese Knüpfungsreaktion wird von der Pyridoxal-5'-phosphat-abhängigen Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) unter Kohlenstoffdioxidabspaltung katalysiert.^[109,111] Da die SPT in Säugetieren bevorzugt gesättigte aktivierte Fettsäuren mit einer Länge von 16 ± 1 Kohlenstoffatomen umsetzt und Palmitoyl-CoA in hohen Mengen vorhanden ist, werden größtenteils C₁₈-Sphingoidbasen gebildet.^[112,113] SPT ist außerdem in der Lage die Aminosäuren L-Alanin und L-Glycin als alternative Substrate zu akzeptieren.^[114] Das aus L-Serin gebildete 3-Ketosphinganine wird daraufhin durch 3-Ketosphinganine-reduktase (KDSR) rasch zu *D-erythro*-Sphinganine, auch Dihydrosphingosin (dhSph) genannt, reduziert. Die selektive Reduktion zum 2*S*,3*R*-konfigurierten Aminoalkohol läuft in Abhängigkeit des protonen- und elektronenübertragenden bzw. des formal hydridionenübertragenden Co-Enzyms Nicotinamid-adenin dinukleotidphosphat (NADPH) ab.^[109,115,116]

Im nächsten Schritt findet die *N*-Acylierung von Sphinganine mit Carbonsäure-CoA-Spezies zu Dihydroceramiden (dhCer) statt.^[109] Die Amidkupplung wird im menschlichen Körper durch sechs verschiedene Ceramidsynthasen (CerS) katalysiert, die gewebespezifisch exprimiert

werden und Fettsäurereste mit unterschiedlichen Kettenlängen einführen.^[117] Beispielsweise setzen CerS5 und CerS6 bevorzugt Palmitoyl-CoA als Substrat um, sodass als Hauptprodukt C₁₆-Dihydroceramid erhalten wird. Längerkettige aktivierte Fettsäuren mit einer Länge von 22, 24 und 26 C-Atomen werden von CerS2 und CerS3 zur Synthese von Dihydroceramiden genutzt.^[117] Der finale Schritt der *de novo*-Sphingolipidsynthese ist die von Dihydroceramid-desaturase (DEGS) katalysierte selektive Einführung der *E*-konfigurierten Doppelbindung zwischen C-4 und C-5. Hierfür wird durch DEGS unter Verwendung von molekularem Sauerstoff zunächst eine Hydroxygruppe an der Position C-4 eingeführt, die nachfolgend einer NAD(P)H-abhängigen Dehydrierungsreaktion unterliegt. Über diese zwei Teilschritte wird die ungesättigte Ceramidstruktur (Sphingosin als Grundgerüst) aufgebaut (Schema 5).^[109,118]

Ceramid stellt als zentrale Verbindung des Sphingolipidmetabolismus die Vorstufe komplexer und im dynamischen Gleichgewicht stehender Sphingolipide dar (Schema 6).



Schema 6: Übersicht des Sphingolipidmetabolismus ausgehend von Ceramid mit den beteiligten Enzymen. (*CerK*: Ceramidkinase, *C1PP*: Ceramid-1-phosphatphosphatase, *CDase*: Ceramidase, *CerS*: Ceramidsynthase, *SK*: Sphingosinkinase, *S1PP*: Sphingosin-1-phosphatphosphatase, *SPL*: Sphingosin-1-phosphatlyase, *SMS*: Sphingomyelinsynthase, *SMase*: Sphingomyelinase, *GalCase*: Galactosylceramidase, *GalCS*: Galactosylceramidsynthase, *GCase*: Glucosylceramidase, *CST*: Cerebrosidsulfotransferase, *GCS*: Glucosylceramidsynthase, *LacCS*: Lactosylceramidsynthase, *SiaT*: Sialyltransferase, *GT*: Glycosyltransferase).^[93,118-121]

Nach der *de novo*-Synthese von Ceramid am ER findet dessen Transport in den Golgi-Apparat statt, in welchem die Enzyme für den Aufbau der komplexeren Sphingolipide lokalisiert sind. Da Ceramid eine sehr geringe Löslichkeit in wässrigen Medien aufweist, existieren in Zellen zwei verschiedene Möglichkeiten für den Transport des amphiphilen Moleküls zwischen verschiedenen Membranen: entweder über Vesikel oder mit Hilfe des Ceramid-Transfer-Proteins (CERT).^[118,122,123] Letzteres transportiert effektiv Ceramide mit einer Fettsäurekettenlänge von 14 bis 20 C-Atomen. Des Weiteren wird das natürliche *D-erythro*-Isomer in Gegenwart von drei anderen Stereoisomeren spezifisch von CERT erkannt.^[124] Ceramid, das über den nicht-vesikulären Weg mittels CERT zum Golgi-Apparat transportiert wird, wird primär zu Sphingomyelin (SM) umgesetzt.^[118] Hierbei überträgt die Sphingomyelinsynthase (SMS) unter Freisetzung von Diacylglycerol eine Phosphocholin-Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf die C-1-Hydroxygruppe des Ceramids.^[125] Sphingomyelin, der häufigste Sphingolipidvertreter in humanen Zellen, kann nach dem Transport zur und dem Einbau in die Zellmembran durch Aktivierung von Sphingomyelinasen (SMase) wieder zu Ceramid katabolisiert werden (Schema 6). Der koordinierte hydrolytische SM-Abbau spielt eine essentielle Rolle bei der Regulierung der Membranhomöostase und bei der Signaltransduktion.^[118,126]

Ceramide, die über den vesikulären Weg zum Golgi-Netzwerk gelangen, werden vorwiegend zu komplexen Glycosphingolipiden metabolisiert. Glucosylceramid (GluCer) und Galactosylceramid (GalCer) werden aus Ceramid und den entsprechenden Uridindiphosphat (UDP)-gebundenen Monohexosen synthetisiert.^[118] Diese beiden Cerebroside mit einer neutralen Monosaccharid-Kopfgruppe stellen die Vorstufen aller weiteren glycosylierten Sphingolipide dar (Schema 6).^[98,127] Die selektive Knüpfung der β -glycosidischen Bindung zwischen Kohlenhydrateinheit und primärer Hydroxygruppe des Sphingolipidgrundgerüsts wird durch Galactosylceramidsynthase (GalCS) bzw. Glucosylceramidsynthase (GCS) katalysiert.^[128,129] Die GluCer-basierte Gruppe der komplexen Ganglioside zeichnet sich durch eine endständige *N*-Acetylneuraminsäureeinheit aus und ist vor allem für ihre Funktion als Blutgruppenantigene bekannt.^[127,130,131] Glycosphingolipide stellen neben Sphingomyelin eine zur *de novo*-Synthese alternative Ceramidquelle für Zellen dar. Die Saccharidkopfgruppen werden zunächst durch spezifische Hydrolasen gekürzt, bis die mit Ceramid direkt im Gleichgewicht stehenden Cerebroside GluCer und GalCer erhalten werden. Diese können schließlich durch die β -Glycosidasen Glucosylceramidase (GCCase) und Galactosylceramidase (GalCase) zu Ceramid umgesetzt werden, welches somit wieder für die Synthese anderer Sphingolipide zur Verfügung steht (Schema 6).^[120,127,132]

Ceramid kann außerdem im trans-Golgi und in der Plasmamembran zu Ceramid-1-phosphat (C1P) umgesetzt werden.^[118] Die Phosphorylierung der Hydroxyfunktion an Position 1 wird durch Ceramidkinase (CerK) katalysiert. CerK setzt bevorzugt Ceramide mit einem SphingosinGrundgerüst und mit Fettsäurekettenlängen von über 12 C-Atomen um.^[133] Die C1P-Konzentration wird zum einen über die CerK-vermittelte Synthese und zum anderen über die Dephosphorylierung zurück zu Ceramid reguliert (Schema 6). C1P, das über den Sekretionsweg zur Plasmamembran gelangt, kann dort durch Ceramid-1-phosphatphosphatase (C1PP) zu Ceramid hydrolysiert werden.^[134,135]

Ein weiterer zentraler Biosyntheseweg von Sphingolipiden ist die Deacylierung von Ceramid unter Bildung von *D-erythro*-Sphingosin (Sph) (Schema 6).^[120] Die Spaltung der Amidbindung wird durch diverse Ceramidasen (CDase) katalysiert, die wie andere Enzyme des Sphingolipidmetabolismus (z. B. SMase) biochemisch nach ihrem pH-Optimum klassifiziert werden: in saure, neutrale und basische CDase.^[136] Ceramidasen werden organellspezifisch exprimiert und zeigen eine gewisse Spezifität gegenüber verschiedener Ceramidspezies. Die freigesetzte Sphingoidbase kann unter Verbrauch von ATP zu Sphingosin-1-phosphat (S1P) metabolisiert oder wieder zu Ceramid recycelt werden (Schema 6).^[118] Letzteres wird auch *Salvage Pathway* genannt und macht etwa 50–90 % der gesamten Sphingolipidbiosynthese aus.^[137] Die Reacylierung von Sphingosin wird mittels Ceramidsynthasen (CerS) erreicht, während die alternative Reaktion zu S1P durch zwei verschiedene Sphingosinkinasen (SK) katalysiert wird.^[138] S1P kann daraufhin wiederum von Sphingosin-1-phosphat-phosphatase (S1PP) zu Sphingosin umgesetzt oder von Sphingosin-1-phosphatlyase (SPL) schließlich zu Phosphoethanolamin und (2*E*)-Hexadecenol abgebaut werden (Schema 6).^[139,140] Wie SPT, das erste Enzym der *de novo*-Sphingolipidsynthese, ist auch SPL als finales Abbauenzym abhängig von Pyridoxal-5'-phosphat.^[118] Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Biosynthesewegen stellt die SPL-katalysierte C-C-Spaltung, die formal eine Retroaldoladdition ist, den einzigen irreversiblen Abbauweg der Sphingolipide über Ceramid als zentrale Verbindung dar.^[141,142] Die beiden Abbauprodukte werden nachfolgend bei der Synthese von Glycerolipiden verwendet.^[143]

Die kontrollierte und strenge Kontrolle des dynamischen Sphingolipidgleichgewichts ist für die Aufrechterhaltung grundlegender Zellprozesse essentiell. Daher führen Störungen und Defekte des Sphingolipidmetabolismus meist zu schwerwiegenden Krankheiten wie Sphingolipidosen. Dies sind seltene vererbte lysosomale Speicherkrankheiten, bei denen genetische Mutationen zu Funktionsstörungen der Enzyme führen, die für den lysosomalen Sphingolipidabbau nötig sind.^[144-146] Nicht abbaubare Lipidspezies akkumulieren folglich in verschiedenen Organen wie

Leber und Milz sowie im Knochenmark und im zentralen Nervensystem und lösen unterschiedliche Krankheitsbilder mit oft tödlichem Ausgang aus.^[144]

Bei der am häufigsten vorkommenden Sphingolipidose, dem Gaucher-Syndrom, führt ein Mangel bzw. eine verringerte Aktivität von Glucosylceramidase (GCase) zur Anreicherung von Glucosylceramid (GluCer). In allen Varianten dieser Speicherkrankheit können betroffene Personen eine Vergrößerung der Leber und der Milz sowie Blutarmut, Thrombozytopenie und Knochenschäden aufweisen.^[145,147] Weitere lysosomale Speicherkrankheiten, die auf einer Glycosphingolipidakkumulation basieren, sind Morbus Krabbe, Morbus Fabry sowie die Tay-Sachs- und Sandhoff-Krankheit.^[144]

Die Niemann-Pick-Krankheit (NPK) des Typs A und B wird dagegen durch die Defizienz der sauren SMase (ASM) und der damit verbundenen Anreicherung von Sphingomyelin (SM) im Gewebe ausgelöst.^[148] Kinder, die an der Typ A-NPK leiden, haben eine Lebenserwartung von nur zwei bis drei Jahren.^[145] In den ersten Lebensmonaten treten Symptome wie Hypotonie, geschwollene Lymphknoten, Milz- und Lebervergrößerung oder Muskelschwäche auf. Später kommt es u. a. zum Auftreten von Osteoporose und einer bräunlich-gelben Hautfarbe. Nach einer allmählich stärker ausgeprägten psychomotorischen Retardierung kommt es schließlich im fortgeschrittenen Krankheitszustand zum Tod. Typ B-NPK wird normalerweise in der Kindheit festgestellt, allerdings können die Patienten das Erwachsenenalter erreichen. Bei stärker betroffenen Personen verursacht zum einen die Milz- und Lebervergrößerung und zum anderen eine fortschreitende Lungeninfiltration schwerwiegendste Krankheitskomplikationen.^[144]

Eine Mangelfunktion der sauren Ceramidase (CDase) führt zu einer anderen tödlich verlaufenden Sphingolipidose, dem sogenannten Farber-Syndrom.^[144,149] Hier kommt es zur Akkumulation von Ceramid (Cer) in zahlreichen Organen und Geweben.^[150] Betroffene Kinder weisen zunächst Gelenksteifheit und -deformation sowie Heiserkeit durch Kehlkopfanomalien auf. Im Verlauf der Krankheit kommen Defekte von Herz, Lunge und des zentralen Nervensystems dazu. Die Lebenserwartung variiert je nach Krankheitsform zwischen wenigen Monaten und sieben Jahren. Allerdings gibt es auch Patienten, die das Teenager- und frühe Erwachsenenalter erreichen.^[151]

Da Sphingolipide und deren assoziierte Enzyme bei einer Vielzahl an bisher nicht heilbaren Krankheiten beteiligt sind, ist die detaillierte Aufklärung des Metabolismus und der zugrundeliegenden Wirkmechanismen aus medizinischer Sicht von großem Interesse. Sphingolipiden wird heute neben der strukturgebenden Funktion in Zellmembranen bereits eine entscheidende Rolle bei hochkomplexen biologischen Prozessen wie der Signaltransduktion zugeschrieben.^[22]

2.2.3 Sphingolipide in der Signaltransduktion

Lange Zeit wurden Sphingolipide lediglich für strukturgebende Bestandteile der Zellmembran gehalten. Wichtige Entdeckungen seit den 1980er-Jahren führten zur Erkenntnis, dass Sphingolipide zusätzlich als bioaktive Mediatoren für zelluläre Prozesse fungieren. Die Grundlage für diesen Paradigmenwechsel lieferte die von Hannun *et al.* beobachtete direkte Hemmung der Proteinkinase C (PKC), einem zentralen Enzym in der Signaltransduktion und Zellregulation, durch Sphingosin.^[152,153] In einer weiteren Studie von Richard N. Kolesnick wurde 1987 die Stimulation der Sphingomyelinhydrolyse und die damit verbundene Ceramidbildung durch 1,2-Diacylglycerole nachgewiesen. Dies deutete darauf hin, dass Sphingomyelinase (SMase) analog zu Phospholipase C in Phosphatidylinositol-Signalwegen wirkt.^[154,155] Kurze Zeit später wurde Sphingosin-1-phosphat (S1P) von der Gruppe um Sarah Spiegel als Signalmolekül, das als intrazellulärer sekundärer Botenstoff (*second messenger*) bei der Zellwachstumsregulierung fungieren kann, vorgeschlagen.^[156] In der Tat handelt es sich bei den drei strukturell einfachen Sphingolipidmetaboliten Ceramid, Sphingosin und S1P um unabdingbare Mediatoren bei der Signalgebung, wenngleich alle zugrundeliegenden mechanistischen Details auf molekularer Ebene noch nicht vollständig geklärt sind.

Zahlreiche Studien fokussierten sich auf die Rolle von Ceramid beim signalvermittelten und regulierten Zelltod (Apoptose). Es sind viele extrazelluläre Signale oder Stimuli bekannt, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Ceramidgehalts führen und Apoptose induzieren. Zu den Auslösern gehören u. a. Hitzestress, ionisierende Strahlung, oxidativer Stress, Tumornekrosefaktor- α , Vitamin D3 und Daunorubicin (Chemotherapeutikum).^[155] Der Ceramidgehalt kann entweder über die *de novo*-Synthese (SPT- und CerS-Aktivierung) oder durch Hydrolyse von Sphingomyelin (SMase-Aktivierung) erhöht werden. Da Sphingomyelin (SM) in den meisten Zelltypen in Konzentrationen vorliegt, die eine Größenordnung höher sind als die von Ceramid, haben minimale SM-Konzentrationsänderungen große Auswirkung auf den Ceramidgehalt.^[87] Ceramidinduzierte Effekte werden hauptsächlich über zwei Mechanismen erreicht. Zum einen kann Ceramid als typischer *second messenger* agieren und an Proteine binden, wodurch deren Aktivität reguliert wird. Darunter fallen z. B. Ceramid-aktivierte Proteinphosphatasen (CAPPs), Proteinkinase C ζ (PKC ζ) und Cathepsin D. Zum anderen werden durch die SM-Hydrolyse ceramidreiche Mikrodomänen in der Plasmamembran generiert, die zu größeren ceramidreichen Membranplattformen (Makrodomänen) fusionieren können.^[155,157] Letztere führen zur lokalen Änderung der biophysikalischen Membraneigenschaft, sodass Rezeptoren angereichert bzw. aggregiert und intrazelluläre Signalmoleküle rekrutiert werden können.^[158,159]

Das mit Ceramid im Gleichgewicht stehende Sphingosin weist je nach Zelltyp eine Förderung oder Minderung der Zellproliferation auf und kann als PKC-Inhibitor Apoptose induzieren.^[160] Diesem intermediären Stoffwechselprodukt zwischen Ceramid und S1P kann keine einheitliche Wirkungsweise zugeschrieben werden. Sphingosin und verwandte Sphingoidbasen spielen bei der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts, der Endozytose, des Zellzyklus und der Apoptose eine Rolle.^[87,161] Die phosphorylierte Spezies S1P, die durch Sphingosinkinase-Stimulation generiert wird, zeigt antagonistische Effekte zu Ceramid und ist an Zellüberleben, -migration und Entzündungsreaktionen (Inflammation) beteiligt.^[162-164] Diese gegenläufigen Wirkungen der ineinander rasch konvertierbaren Metaboliten, die über das Schicksal der Zelle entscheiden, sind im sogenannten Sphingolipid-Rheostat zusammengefasst (Abbildung 5).^[165-167]

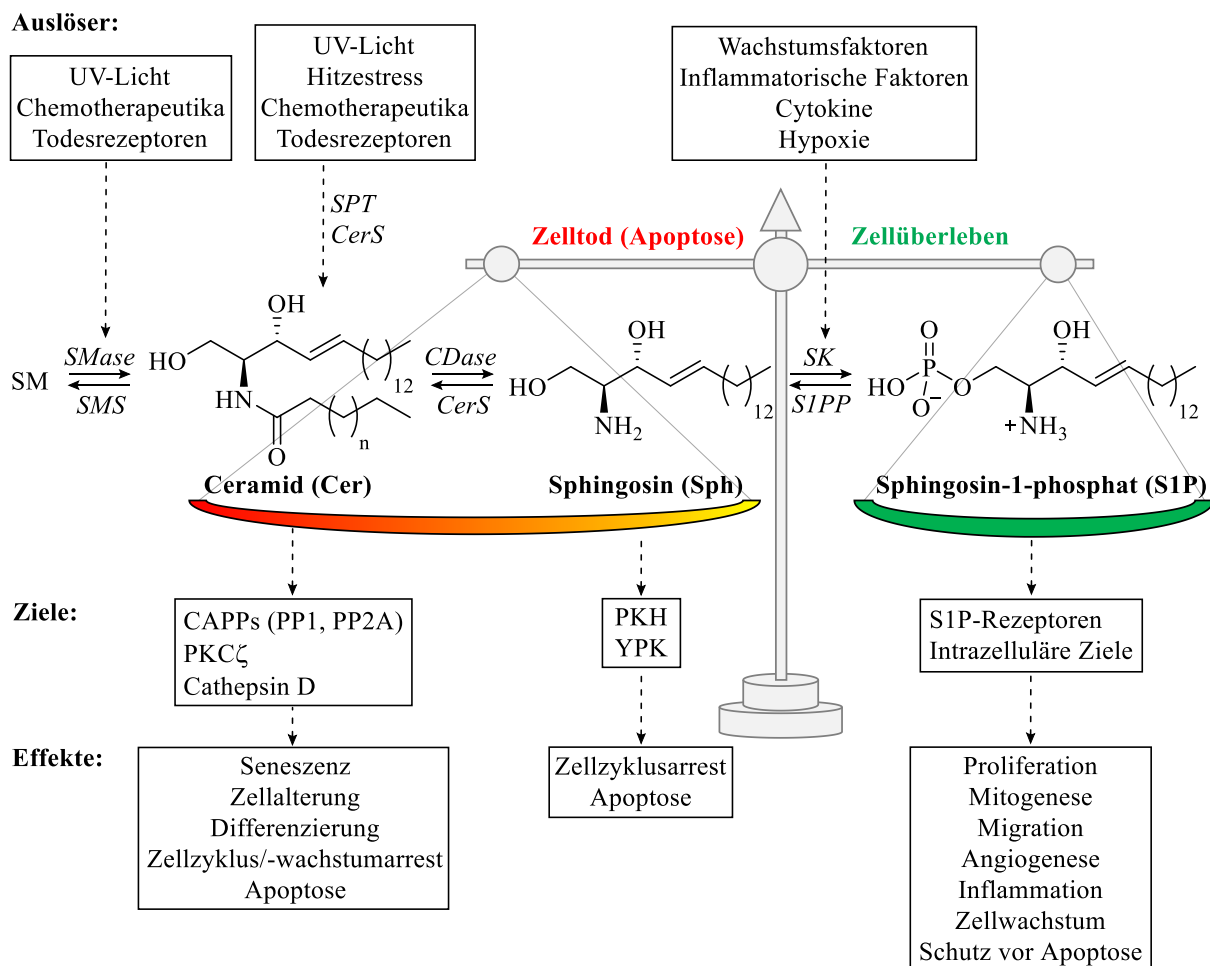


Abbildung 5: Gleichgewicht der Sphingolipide Sphingomyelin (SM), Ceramid (Cer), Sphingosin (Sph) und Sphingosin-1-phosphat (S1P), welches über den Tod oder das Überleben der Zelle entscheidet. Veränderungen dieses Gleichgewichts werden durch verschiedene Faktoren ausgelöst, wobei es nach der Signaltransduktion zu unterschiedlichen Effekten kommt. (CAAPs: Ceramid-aktivierte Proteinphosphatasen; PP1: Proteinphosphatase 1; PP2A: Proteinphosphatase 2A; PKC ζ : Proteinkinase C des Isotyps ζ ; PKH: Proteinkinase B-aktivierendes Kinase-homolog; YPK: Hefeproteinkinase).^[87]

Die gezielte Aktivierung oder Hemmung von Sphingolipid-assoziierten Signalwegen stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz gegen verschiedene Krankheiten wie Krebs oder Autoimmunkrankheiten dar.^[143,168,169] Das bekannteste Beispiel für die erfolgreiche Modulation des S1P-Signalwegs als medizinische Anwendung ist Fingolimod (FTY720), das als immunsuppressiver Arzneistoff bei der Behandlung von Multipler Sklerose eingesetzt wird.^[170,171] FTY720 wirkt nach der Phosphorylierung durch Sphingosinkinasen zu FTY720P als S1P-Analogon und bindet an vier der fünf auf der Zelloberfläche vorhandenen G-Proteingekoppelten S1P-Rezeptoren.^[172] Für den Wirkmechanismus ist vor allem die Bindung an den S1P₁-Rezeptor verantwortlich, die zur Internalisierung des Rezeptors und zur verminderten Freisetzung von autoaggressiven Lymphozyten in das zentrale Nervensystem führt.^[173]

Da Sphingolipide und Sphingolipidsignalwege ebenfalls bei Infektionsprozessen eine wichtige Rolle spielen, werden diese in den letzten Jahren verstärkt für die Entwicklung neuartiger Antibiotika, insbesondere gegen die rasch steigende Zahl multiresistenter Stämme, untersucht.^[174]

2.2.4 Antibakterielle Wirkung von Sphingolipiden

Sphingolipide sind auf verschiedenste Weise bei bakteriellen Infektionen beteiligt. In vielen Fällen hängen die Anlagerung und Aufnahme der mikrobiellen Erreger sowie die Entwicklung und das Überleben der Bakterien in der Wirtszelle von Sphingolipiden ab. Darüber hinaus besitzen einige natürliche Sphingolipide antibakterielle Eigenschaften und hemmen das Wachstum bestimmter Bakterienstämme bzw. verhindern die Bildung von Biofilmen.^[175]

Der erste Hinweis auf die antibakterielle Wirkung von Sphingosin (**1**) *in vitro* stammt von René Jules Dubos, der 1948 nach Zugabe der Sphingoidbase eine Wachstumshemmung von *Mycobacterium tuberculosis* beobachtete.^[176] Auch für Sphingosin-1-phosphat (S1P) wurden *in vitro* und *in vivo* antimikrobielle Effekte gegen *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* nachgewiesen.^[177] Bei der angeborenen Immunabwehr gegen bakterielle Infektionen der Haut und der Schleimhäute (Selbstdesinfektion) spielen neben Fettsäuren antibakteriell wirkende Sphingoidbasen wie Sphingosin (**1**) und Sphinganine (**2**) eine wichtige Rolle.^[178-180] Nach Fischer *et al.* zeigen die Sphingolipide **1**, **2** und Phytosphingosin (**3**) (Abbildung 6) *in vitro* antibakterielle Eigenschaften gegen eine Vielzahl an gramnegativen und grampositiven Bakterien mit MBC-Werten (minimale bakterizide Konzentration) von 0.3–62.5 µg·mL⁻¹, jedoch keine Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa*.^[181,182] Bemerkenswerterweise schützt die Inhalation von Sphingosin (**1**) in Mäusen vor einer bakteriellen Lungeninfektion durch *P. aeruginosa*, wobei lediglich

eine geringe Toxizität auf den Atemtrakt ausgeübt wird.^[183,184] Eine 2019 veröffentlichte Studie an Minischweinen belegt, dass die Inhalation von vernebeltem Sphingosin (**1**) zu einem Anstieg der Sphingosinkonzentration in der luminalen Plasmamembran von Tracheal- und Bronchialepithelzellen führt.^[185] Da keine systemischen und lokalen Nebenwirkungen zu beobachten sind, stellt **1** ein vielversprechendes antibakterielles Medikament gegen Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* oder *S. aureus* bei z. B. Mukoviszidose- und Beatmungspatienten dar.

In einer 2016 von Vijai Kumar Reddy *et al.* durchgeführten Arbeit wurde die antimikrobielle und antifungale Wirkung von C₁₂-Sphingalin und verschiedener 1,2,3-Triazolderivate *in vitro* evaluiert.^[186] Beispielsweise zeigen die über CuAAC generierten Verbindungen **6** und **7** (Abbildung 6) mit MIC-Werten (minimale Hemmkonzentration) von 7.8 µg·mL⁻¹ die gleiche antimikrobielle Aktivität gegen *Bacillus subtilis*. Das Triazol **7** stellt die vielversprechendste antibakterielle Substanz der Studie dar, da sie gegen alle getesteten grampositiven Bakterien (MIC-Werte von 3.9 bis 7.8 µg·mL⁻¹) sowie gegen das gramnegative Bakterium *Klebsiella planticola* (MIC = 15.6 µg·mL⁻¹) stark bis moderat wachstumshemmende Eigenschaften aufweist. Die antimikrobielle Wirkung des Phenolderivats **7** gegen *Micrococcus luteus* entspricht der von C₁₂-Sphingalin. Außerdem ist erwähnenswert, dass Triazol **6**, das Click-Konjugat mit Oct-1-in, die stärkste Inhibitionskraft (MIC = 3.9 µg·mL⁻¹) gegen *Staphylococcus aureus* MTCC 96 zeigt, während **7** eine geringere und C₁₂-Sphingalin keine antibakterielle Wirkung aufweist.^[186] Weitere von der Gruppe um Arturo San Feliciano synthetisierte Sphingalinanaloge mit Ether- und Diamineinheiten zeigen *in vitro* eine effektive Wirkung gegen empfindliche sowie multiresistente *M. tuberculosis*-Stämme.^[187]

Neben Sphingoidbasen stellen Ceramide und deren Derivate potenzielle antimikrobielle Wirkstoffe dar. In der 2015 von Saied *et al.* veröffentlichten Arbeit wurden insgesamt 24 Ceramidderivate auf wachstumshemmende Aktivität gegenüber den intrazellulären Erreger *Chlamydia trachomatis* getestet. Drei davon zeigen eine ausgeprägte Wirkung, die um eine Größenordnung höher als die des Antibiotikums Chloramphenicol ist. Die getesteten Ceramidderivate wurden gezielt an der Position 1 zu Desoxyverbindungen oder (Thio-)Methylethern modifiziert, sodass keine Metabolisierung zur entsprechenden Sphingomyelinspezies möglich ist.^[188]

Die natürlichen Ceramide **4** und **5** sowie die, erstmals in unserer Arbeitsgruppe synthetisierten, azidmodifizierten Analoga **8–11** (Abbildung 6) wurden 2017 von Becam *et al.* bezüglich ihrer antibakteriellen Aktivität gegen *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* untersucht. Für das kurzkettige C₆-Cer (**4**) und für das Azido-derivat ω-N₃-C₆-Cer (**8**) wird eine Aktivität gegen die gramnegativen Erreger *N. meningitidis*

und *N. gonorrhoeae* beobachtet, während keine Aktivität gegenüber *E. coli* und dem grampositiven Bakterium *S. aureus* festgestellt wird. Das α -N₃-modifizierte C₆-Ceramid **10** sowie alle langkettigen Ceramidvarianten, d. h. C₁₆-Cer (**5**), ω - und α -N₃-C₁₆-Cer (**9**, **11**), zeigen keine signifikante bakterizide Wirkung gegen pathogene *Nesseria*. Insgesamt stellt Verbindung **8** die vielversprechendste Substanz dieser Studie dar, da deren antibakterieller Effekt sogar über dem des nicht modifizierten Ceramids **4** liegt. Des Weiteren führt ω -N₃-C₆-Cer (**8**) bei 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (= 1 x MIC) im Gegensatz zum natürlichen C₆-Cer (**4**) nach zwei Stunden zur vollständigen Abtötung von *N. meningitidis*. Da bei den eingesetzten Konzentrationen keine Zytotoxizität gegenüber humanen Wirtszellen beobachtet wird, handelt es sich bei Ceramiderivat **8** um einen erfolgsversprechenden Wirkstoffkandidaten gegen gramnegative Erreger. Bioorthogonal funktionalisierte N₃-Ceramide ermöglichen außerdem *via* SPAAC hochauflösende fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen des Ceramideinbaus in die Bakterienmembranen.^[189,190]

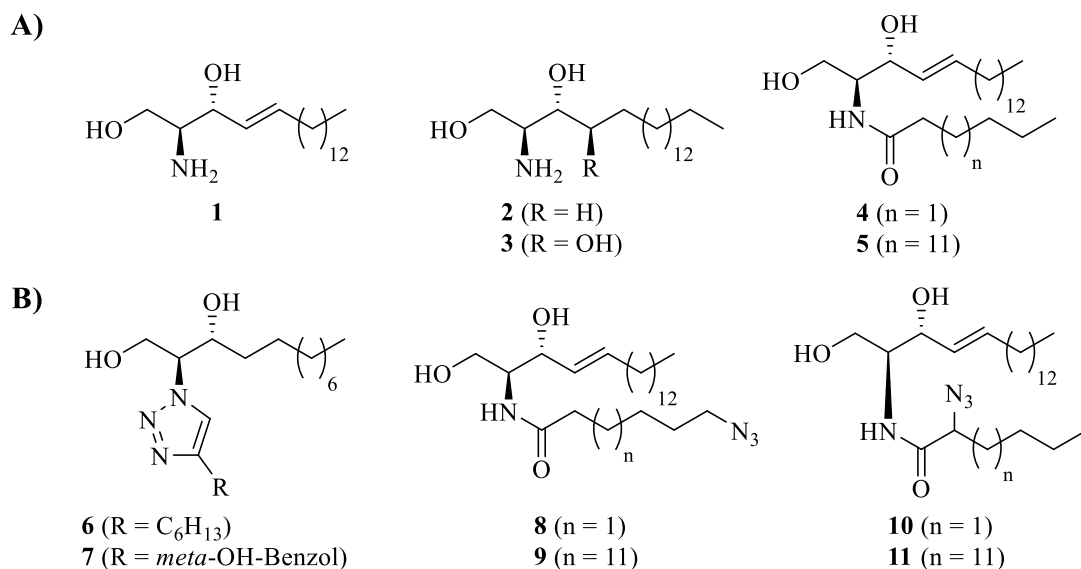


Abbildung 6: Auswahl an natürlichen (A) und modifizierten (B) Sphingolipiden, die in verschiedenen Studien zur Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaft von Sphingolipiden eingesetzt wurden.

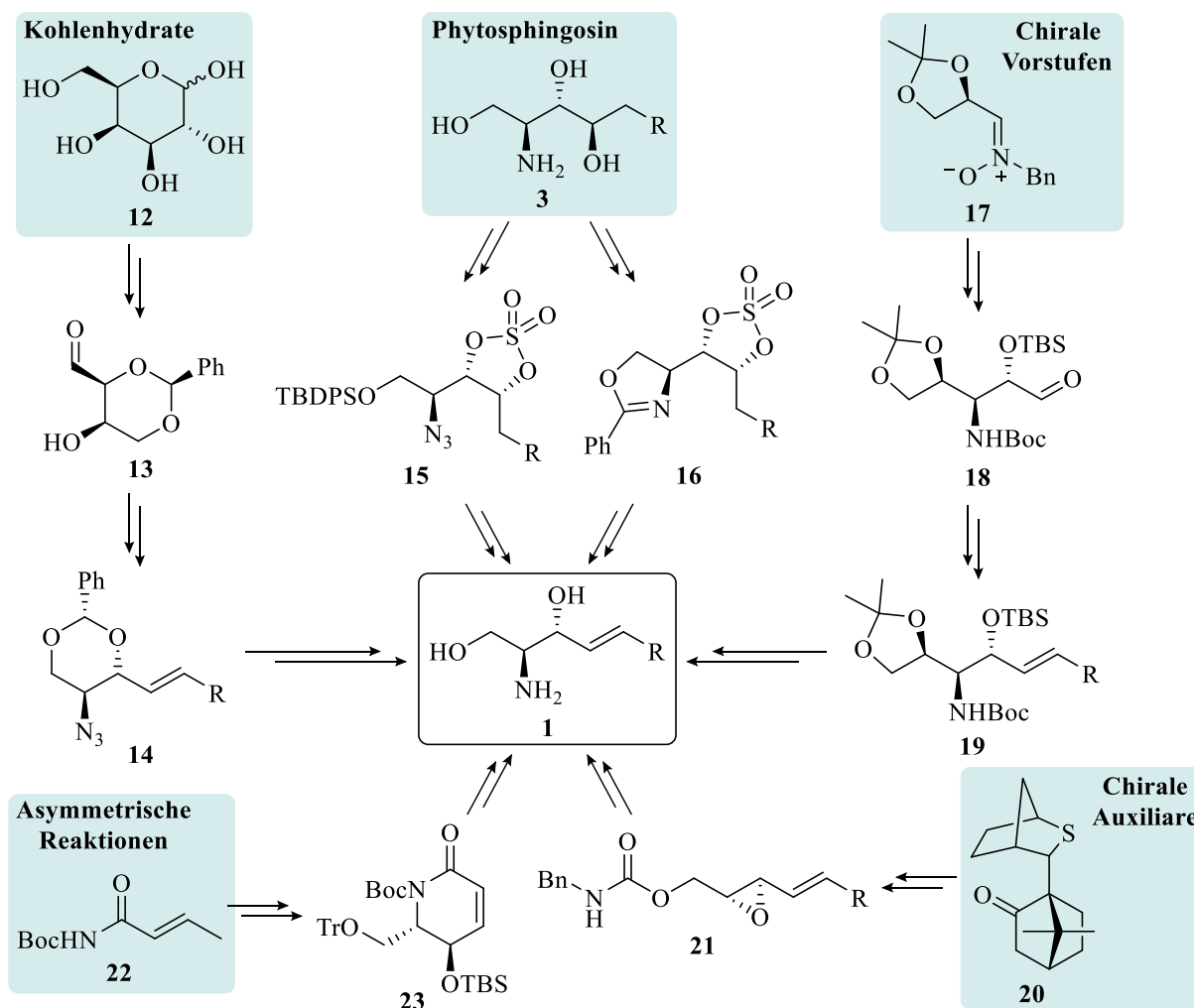
Über den genauen Wirkmechanismus der antimikrobiellen Aktivität von Sphingolipiden, v. a. Ceramiden, ist gegenwärtig wenig bekannt.^[189] Einer Studie von 2020 zufolge resultiert die bakterizide Wirkung von Sphingosin (**1**) gegen *P. aeruginosa* und *S. aureus* aus der Protonierung der Aminogruppe. Die NH₃⁺-Spezies bindet an das negativ geladene Lipid Cardiolipin in den Plasmamembranen der Bakterien und führt zur Permeabilisierung, zum Verlust von ATP sowie der bakteriellen Stoffwechselaktivität und schließlich zum Tod der Bakterien.^[191]

Seit der Erkenntnis, dass Sphingolipide nicht nur als Strukturgeber in Zellmembranen dienen, sondern auch als bioaktive (Signal-)Moleküle in zahlreichen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind, wurden verschiedene Methoden zur Isolierung und Synthese von Sphingolipiden entwickelt. Insbesondere die gezielte Synthese von Sphingolipidanaloga mit antimikrobiellen Eigenschaften stellt einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung und strukturelle Optimierung neuer Wirkstoffe gegen bakterielle Erreger und Infektionskrankheiten dar.

2.2.5 Chemische Synthese von Sphingolipiden

Sphingolipide können aus natürlichen Quellen wie Pflanzen, Tieren oder Pilzen isoliert werden, wobei die Wahl des Ausgangsmaterials je nach Verfügbarkeit, Zusammensetzung und Gehalt der gewünschten Sphingolipidspezies unterschiedlich ausfällt.^[192] Kommerziell erhältliche Sphingolipide wie Sphingomyelin, Ceramid und Sphingosin werden oft aus Rinderhirnen und Hühnereiern gewonnen.^[193-195] Da die im Gewebe vorhandene Menge an freien Sphingoidbasen geringer ist als die von komplexeren Sphingolipiden (Sphingomyelin, Glycosphingolipide), werden letztere häufig mittels saurer oder basischer Hydrolyse bei hohen Temperaturen zu den gewünschten Sphingoidbasen umgesetzt. Bei dieser semisynthetischen Methode werden zwar die Kopfgruppen und Fettsäurereste wie gewünscht abgespalten, jedoch sind Nebenreaktionen wie Epimerisierung und Substitution an der C-3-Position, *N*-Acylmigration oder Allylumlagerungen möglich.^[196-200] Aufgrund der aufwendigen Isolierung, schwierigen Reinigung bzw. Trennung der inhomogenen Gemische und den geringen Lipidmengen, die aus den natürlichen Materialien erhalten werden, wurden bereits unterschiedliche chemische Synthesemethoden zur effizienten Gewinnung definierter Sphingoidbasen entwickelt.^[201]

Die erste Sphingosin-Totalsynthese wurde im Jahr 1954 von David Shapiro und Khyaim Segal erfolgreich durchgeführt.^[202] Heute umfassen die Methoden zur Darstellung der Sphingoidbase unterschiedliche Syntheserouten ausgehend von Substraten aus dem *Chiral Pool* wie Kohlenhydrate und Phytosphingosin. Zudem sind asymmetrische Reaktionen ausgehend von achiralen Substraten oder Synthesen mit chiralen Auxiliaren bekannt (Schema 7).^[201] Der selektive Aufbau beider Stereozentren C-2 und C-3 mit *anti*-Orientierung der Amino- und Hydroxygruppe, die Kettenverlängerung des aliphatischen Lipidschwanzes sowie die Generierung der *E*-konfigurierten C-C-Doppelbindung stellen die synthetischen Herausforderungen dar. Diese können jedoch durch eine geschickte Wahl an geeigneten Reagenzien und Reaktionsabfolgen inklusive Schutzgruppenchemie überwunden werden.



Schema 7: Auswahl an unterschiedlichen Synthesestrategien zum selektiven Aufbau von Sphingoidbasen mit wichtigen Zwischenstufen am Beispiel Sphingosin (1, R: C₁₃H₂₇).

Für die Synthese von Sphingosin eignet sich z. B. das Saccharid D-Galactose (12) als chirales Ausgangssubstrat (Schema 7). Hierbei läuft die 2001 von Richard I Duclos Jr. beschriebene Route über insgesamt sieben Stufen ab.^[203] Schlüsselschritt zum Aufbau des C₁₈-Gerüsts und der *E*-konfigurierten C-C-Doppelbindung ist eine Wittig-Olefinierung zwischen dem Aldehyd 1,3-*O*-Benzyliden-D-Threose (13) und einem *n*-Tetradecylphosphorylid. Die Einführung der Aminofunktion erfolgt über drei Schritte: Mesylierung der Hydroxyfunktion, Substitution mit Natriumazid unter Ausbildung von Verbindung 14 und Reduktion der Azidgruppe mit Schwefelwasserstoff in wässrigem Pyridin. Neben D-Galactose (12) finden andere Kohlenhydrate wie D-Xylose, D-Glucose und D-Mannose Einsatz bei der Sphingosinsynthese.^[204-208]

Ein weiteres Startmaterial aus dem *Chiral Pool* stellt Phytosphingosin (3) (Schema 7) dar, welches durch Fermentationsprozesse kostengünstig in hoher Reinheit und großen Mengen erhalten werden kann.^[209-211] Die relevanten Stereoinformationen an C-2 und C-3 sind bei 3

bereits vorhanden, sodass die größte Herausforderung in der selektiven Ausbildung der (*E*)-Doppelbindung unter Abspaltung der C-4-Hydroxygruppe liegt. Insbesondere von van den Berg *et al.* und Kim *et al.* wurden seit 2002 stetig alternative und verbesserte phytosphingosinbasierte Synthesestrategien zur Darstellung von Sphingosin entwickelt.^[211-215] Bei der 2006 veröffentlichten Variante wird zunächst die Aminfunktion von Phytosphingosin (**3**) als Azidgruppe maskiert und die primäre OH-Gruppe selektiv als *tert*-Butyldiphenylsilyl (TBDPS)-ether geschützt. Anschließend erfolgt die Umsetzung zum cyclischen Sulfatintermediat **15** (Schema 7), das dann in einer Eintopfreaktion mit Tetra-*n*-butylammoniumiodid (TBAI) geöffnet wird. Der gebildete Iodoalkohol unterliegt daraufhin unter Einsatz von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) einer Eliminierungsreaktion, die zur (*E*)-Doppelbindung führt. Die Abspaltung der Silylschutzgruppe mit Fluoridionen und die Reduktion des Azids mit Natriumborhydrid liefert schließlich die gewünschte Sphingoidbase **1**, die somit über insgesamt neun Stufen mit einer Gesamtausbeute von 53 % ausgehend von **3** erhalten wird.^[214] Die 2011 publizierte Syntheseroute führt dagegen über sieben Stufen, unter anderem dem cyclischen Sulfatintermediat **16** (Schema 7), mit einer Gesamtausbeute von 67 % zu **1**. Die primäre Hydroxy- und sekundäre Aminofunktion von Phytosphingosin (**3**) werden dabei durch Zugabe von Benzimid säureethylester als Oxazolin geschützt. Die *E*-konfigurierte C-C-Doppelbindung wird ebenfalls durch Iodierung von **7** und anschließender HI-Eliminierung aufgebaut.^[211]

Die von Sankar *et al.* entwickelte und 2018 veröffentlichte Sphingosinsynthese erfolgt über nur insgesamt fünf Stufen ausgehend von Phytosphingosin (**3**). Die Aminofunktion wird hierfür entweder als Azidgruppe maskiert oder als Phthalimid geschützt. Nach der regioselektiven Generierung einer 1,3-*O*-Benzylidenverbindung wird die C-4-Hydroxygruppe durch Iodierung oder Tosylierung in eine bessere Abgangsgruppe umgewandelt. Daraufhin erfolgen die DBU-vermittelte β -Eliminierung unter Ausbildung der (*E*)-Doppelbindung und die Eintopfreaktion zur Ringöffnung und Freisetzung der Aminogruppe. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Varianten sind zwar weniger Schritte zum Aufbau von Sphingosin (**1**) nötig, jedoch werden deutlich geringere Gesamtausbeuten von 25 und 17 % erreicht.^[216]

Eine weitere chirale Vorstufe für die Sphingosinsynthese stellt *N*-Benzyl-2,3-*O*-isopropyliden-D-glyceraldehydnitron **17** (Schema 7) dar, das mit einem 2-Silyloxysilylketenacetal in einer Mannich-Reaktion umgesetzt werden kann.^[217] Die gewünschte Konfiguration der generierten stereogenen Zentren wird durch Zugabe der aktivierenden Lewis säure Zink(II)-triflat erzielt. Der Schlüsselschritt zum Aufbau der *E*-konfigurierten C-C-Doppelbindung und zur Einführung der langen Alkylkette ist eine Wittig-Olefinierungsreaktion von Aldehyd **18** zu Verbindung **19** (Schema 7). Die säurekatalysierte Abspaltung der Acetalschutzgruppe, die Glykolspaltung der

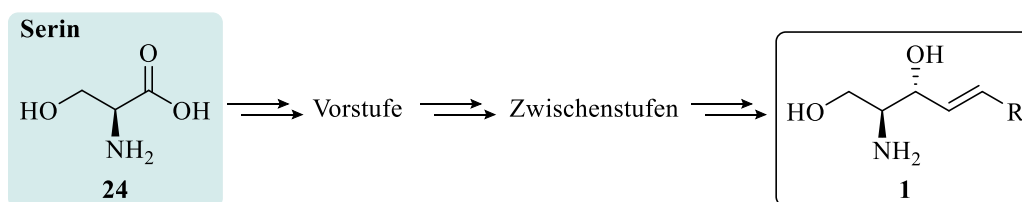
freiwerdenden Dioleinheit mit Natriumperiodat, die Aldehydreduktion mit Natriumborhydrid zum primären Alkohol, die *tert*-Butyldimethylsilyl (TBS)-etherspaltung und die Freisetzung der Aminofunktion mittels Trifluoressigsäure (TFA) liefern schließlich Sphingosin (**1**).^[217]

Zudem kann für die enantioselektive Sphingosinsynthese das chirale Sulfid **20** (Schema 7) als Auxiliar eingesetzt werden. Die 2008 von Morales-Serna *et al.* veröffentlichte Syntheseroute über Epoxid **21** liefert die Sphingoidbase **1** mit einer Gesamtausbeute von 42 % über sechs Stufen.^[218] Schlüsselschritte bei dieser Methode sind die asymmetrische Schwefelylid-Reaktion mit einem Aldehyd zu Epoxid **21** mit gewünschter Konfiguration, die regio- und stereoselektive intramolekulare Epoxidöffnung unter Ausbildung eines Oxazolidinons sowie dessen alkalische Hydrolyse zu **1**.^[201] Eine andere Schwefelylid-basierte Sphingosinsynthese wurde 2012 von Sarabia *et al.* vorgestellt. Als Ausgangsverbindung des bicyclischen Auxiliars dient hier die α -Aminosäure L-Methionin.^[219] Neben schwefelhaltigen Auxiliaren können auch chirale stickstoffhaltige Salze zur Synthese von Sphingoidbasen eingesetzt werden. Disaddee *et al.* beschrieben 2005 den Chiralitätstransfer eines Guanidiniumylids auf 3-Alkenylaziridin-2-carboxylate, die als Vorstufen von **1** dienen.^[220]

Eine weitere Strategie zur Darstellung von Sphingosin (**1**) ist die Verwendung achiraler Startmaterialien, bei denen die erforderlichen Stereozentren durch asymmetrische Reaktionen wie Sharpless-Dihydroxylierung und -Epoxidierung eingeführt werden können.^[201,221,222] Darüber hinaus ermöglicht eine asymmetrische iridiumkatalysierte Allylaminierung der α,β -ungesättigten Carbonylverbindung **22** die Synthese von **1** (Schema 7). Die von Hoecker *et al.* entwickelte Methode beinhaltet bis zum Intermediat **23** eine iridiumkatalysierte Allylsubstitutionsreaktion, eine Ringschlussmetathese, eine Epoxidierungs- und Eliminierungsreaktion sowie die Silylschutzgruppeneinführung. Die reduktive Ringöffnung des ungesättigten *N*-Acyl- δ -Lactams **23** erfolgt unter Luche-Bedingungen mit Cer(II)-chlorid und Natriumborhydrid, wobei ein Allylalkohol gebildet wird. Dieser wird über zwei weitere Stufen zu einem Aldehyd umgesetzt, der zum C-C-Doppelbindungsaufbau der Sphingoidbase *via* Julia-Kocienski-Reaktion dient. Dabei wird eine *E/Z*-Selektivität von 88:12 erreicht. Im letzten Schritt werden unter Ausbildung von Sphingosin (**1**) alle drei Schutzgruppen mittels TFA abgespalten.^[223]

Die meisten chemischen Synthesen von Sphingoidbasen orientieren sich jedoch an der *de novo*-Biosynthese und gehen von L-Serin (**24**) aus (Tabelle 1). Diese Aminosäure bietet den Vorteil, dass sie die Aminoalkoholeinheit des Sphingolipidkopfmotivs sowie die richtige Konfiguration von C-2 bereits mitbringt. Die Herausforderung besteht in der stereoselektiven Reduktion der Carbonylgruppe und der C-C-Bindungsknüpfung unter Ausbildung der (*E*)-Doppelbindung.

Tabelle 1: Auswahl an unterschiedlichen Synthesestrategien zum Aufbau von Sphingoidbasen ausgehend von L-Serin (**24**) mit wichtigen Zwischenstufen und den C-C-Knüpfungsreaktionen zum Aufbau des C₁₈-Grundgerüsts am Beispiel Sphingosin (**1**, R: C₁₃H₂₇).



Vorstufen	Wichtige Zwischenstufen	Schlüsselreaktionen zum Aufbau des C ₁₈ -Gerüsts
Aldehyd 25	 26 27	Addition von Lithiumorganyl
	 28 27	Nickel-katalysierte reduktive Kupplung mit Alkynylsilan
Ester 29	 30 31	Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)-Olefinierung
Säure 32	 33 26	Addition von Lithiumorganyl
Thioester 34	 35 36	Liebeskind-Srogl-Kupplung
Weinreb-Amid 37	 38 36	Olefinkreuzmetathese

Der Grundstein für die Synthese von Sphingosin (**1**) ausgehend von L-Serin (**24**) wurde in den 80er-Jahren von Philip Garner gelegt.^[224,225] Das erstmals von ihm dargestellte konfigurationsstabile 1,1-Dimethylethyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolin-3-carboxylat bzw. *N*-Boc-D-serinal-acetonid ist unter dem Begriff Garner-Aldehyd (**25**) (Tabelle 1) bekannt und wird heute als chirale Ausgangssubstanz bei vielzähligen Syntheserouten zu unterschiedlichen Naturstoffen wie Sphingosin (**1**) eingesetzt.^[226] Durch Addition eines nukleophilen Organyls an den Aldehyd wird unter Ausbildung einer Hydroxygruppe eine neue C-C-Bindung geknüpft. In den 1988 unabhängig voneinander veröffentlichten Pionierarbeiten von Herold *et al.* und Garner *et al.* wurde die stereoselektive Bildung der *anti*-Zwischenstufe **26** (Tabelle 1) durch die Addition von lithiiertem Pentadec-1-in zu (*S*)-Garner-Aldehyd (**25**) in Tetrahydrofuran (THF) bei tiefen Temperaturen beschrieben.^[225,227] Bei Zugabe von Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPA) kann die *anti/syn*-Selektivität von 8:1 zu 20:1 gesteigert werden. Dies ist auf die Koordination des Additivs an die Lithiumkationen zurückzuführen, wodurch die Li-Cluster aufgebrochen und die Nukleophilie des Alkins gesteigert werden. Unter kinetischer Kontrolle wird das Carbonylkohlenstoffatom des Aldehyds unter Ausbildung des *anti*-Produkts nukleophil von der sterisch begünstigten *Re*-Seite angegriffen (Felkin-Anh-Modell).^[226,228] Wird die Addition des Lithiumorganyls dagegen in Gegenwart von Zink(II)-bromid in Diethylether durchgeführt, führt das chelatisierende Metall über einen cyclischen Übergangszustand (Cram-Chelat-Modell) zum diastereomeren *syn*-Alkinol (*threo*-Isomer).^[226,227] Die anschließende selektive Reduktion der C-C-Dreifachbindung zur gewünschten *trans*-Doppelbindung erfolgt beispielsweise ausgehend von **26** zu Olefin **27** (Tabelle 1) mit Lithium in Ethylamin (Benkeser-Reaktionsbedingungen) oder nach der säurevermittelten Spaltung des *N,O*-Acetals mit Natrium-bis(2-methoxyethoxy)-aluminiumhydrid (Red-Al[®]) in Diethylether.^[225,227,229,230] Findet die partielle Hydrierung der Dreifachbindung dagegen mit Wasserstoff unter Verwendung des Lindlar-Katalysators statt, wird die (*Z*)-konfigurierte Doppelbindung generiert.^[227,231] Nach Aufbau des C₁₈-Gerüsts mit (*2S,3R,4E*)-Konfiguration und Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe wird schließlich Sphingosin (**1**) erhalten.

Die Zwischenstufe **27** kann zudem über alternative Syntheserouten ausgehend von (*S*)-Garner-Aldehyd (**25**) dargestellt werden. Murakami *et al.* demonstrierten 2002 eine effiziente und sehr diastereoselektive Addition von 1-Alkenylnukleophilen an Aldehyd **25**. In Gegenwart von ZnBr₂ reagiert das eingesetzte 1-Alkenylzirconocenchlorid, welches zuvor durch Hydrozirconierung aus Pentadec-1-in generiert wurde, mit **25** zum *anti*-Addukt **27**.^[232] Ferjančić *et al.* entwickelten 2013 eine Methode der Sphingosinsynthese, die auf einer Nozaki-Hiyama-Kishi-Kupplung als Schlüsselschritt zur Knüpfung des C₁₈-Gerüsts basiert. Durch den Einsatz von

(*E*)-1-Iodpentadec-1-en, Chrom(II)-chlorid und katalytischen Mengen Nickel(II)-chlorid wird ein Alkenylchrom(III)-Reagenz gebildet, welches unter Ausbildung der Zwischenstufe **27** eine Addition mit Aldehyd **25** eingeht.^[233] Den nukleophilen Angriff von Vinylmagnesiumbromid an (*S*)-Garner-Aldehyd (**25**) nutzten Arenz *et al.* zur Darstellung eines Allylalkohols, der nachfolgend über eine Olefinkreuzmetathese mit Pentadec-1-en und Hoveyda-Grubbs-Katalysator der zweiten Generation zu Verbindung **27** als Vorstufe von Sphingosin (**1**) führt.^[234]

Eine 2009 von Montgomery *et al.* vorgestellte Variante der Sphingosinsynthese ausgehend von Aldehyd **25** läuft über die Zwischenstufe **28** (Tabelle 1) ab.^[235] Diese wird durch eine nickel-katalysierte reduktive Kupplung des α -Aminoaldehyds mit Trimethylsilyl (TMS)-geschütztem Pentadecin gebildet. Als Katalysatorsystem dient ein Gemisch aus *tert*-Butanol, 1,3-Dimethylimidazoliumchlorid und dem Ni(0)-Komplex Bis(cycloocta-1,5-dien)nickel (Ni(COD)₂). Zur *in situ*-Schätzung der sekundären Hydroxygruppe wird Triisopropylsilan (TIPSH) zugesetzt. Die Entfernung der beiden Silylgruppen unter Ausbildung der Zwischenstufe **27** (Tabelle 1) wird mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) und die finale Carbamatspaltung mittels HCl erreicht, wodurch Sphingosin (**1**) freigesetzt wird.

Neben dem bekannten Serinal **25** können auch andere Serinderivate ohne Aldehydfunktion als Vorstufen der Sphingoidbase **1** eingesetzt werden. Beispielsweise präsentierten Lee *et al.* 2002 eine sechsstufige Route zu **1** ausgehend von L-Serinmethylesterhydrochlorid (**29**) (Tabelle 1) mit einer Gesamtausbeute von 51 %.^[236] Dabei werden zunächst die primäre Hydroxy- und die Aminofunktion von **29** geschützt. Nachdem der Ester in ein β -Ketophosphonat umgewandelt wurde, geht dieses eine Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)-Olefinierung unter Masamune-Bedingungen (DBU, LiCl) mit Tetradecylaldehyd ein, wodurch Enon **30** mit *E*-Konfiguration (Tabelle 1) gebildet wird.^[236,237] Nach der Behandlung mit HCl in einem THF-Methanol-Gemisch wird das 3-Ketosphingosinsalz **31** (Tabelle 1) erhalten, das daraufhin mit Zn(BH₄)₂ in THF bei -78 °C stereoselektiv zu *D-erythro*-Sphingosin (**1**) reduziert wird.^[236] Eine weitere Methylester-basierte Sphingosinsynthese wurde von Chun *et al.* entwickelt.^[238] Die Schlüsselschritte zum Aufbau der Sphingoidbase sind bei dieser Methode die nukleophile Addition eines Sulfoxidations an den Ester, Zersetzung des Sulfoxidintermediats zu einem (*E*)-konfigurierten Enon sowie dessen diastereoselektive Reduktion und Hydrolyse.

Eine kurze Syntheseroute über fünf Stufen ausgehend von (*S*)-Garner-Säure (**32**) (Tabelle 1) zu Sphingosin (**1**) mit einer Gesamtausbeute von 33 % wurde 2013 von Morales-Serna *et al.* beschrieben.^[201,239] Die *in situ*-Säureaktivierung mit dem klassischen Kupplungssystem aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)

führt zum reaktiven Benzotriazolester **33** (Tabelle 1), der durch Zugabe von Pentadec-1-in-1-yllithium ein Keton generiert. Dieses kann mit NaBH₄ und CeCl₃ zu Alkohol **26** (Tabelle 1) reduziert werden, während die Reduktion der C-C-Dreifachbindung zur (*E*)-Doppelbindung unter Benkeser-Bedingungen erfolgt. Sphingosin (**1**) wird anschließend durch säurevermittelte Abspaltung der Schutzgruppen erhalten.^[239]

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung des C₁₈-Gerüsts mit (*E*)-Konfiguration ist die 2007 von Lanny S. Liebeskind vorgestellte racemisierungsfreie palladiumkatalysierte und kupfervermittelte Kreuzkupplung zwischen Thioester **34** (Tabelle 1) und einer Vinylborsäure.^[240] Das gebildete Keton **35** kann anschließend mit LiAl(O^tBu)₃H stereoselektiv zu Allylalkohol **36** (Tabelle 1) reduziert werden und nach der Schutzgruppenabspaltung Sphingosin (**1**) freisetzen. Die Gruppe um Liebeskind erreichte mit dieser Methode ausgehend von L-Serin (**24**) über sechs Stufen, darunter Thioester **34**, eine Gesamtausbeute von 71 %.

Im Jahr davor zeigten Yamamoto *et al.* den Aufbau des Sphingolipidrückgrats mit Hilfe des Weinreb-Amids **37** (Tabelle 1) und einer Olefinkreuzmetathese als Schlüsselschritt.^[241] Allylalkohol **38** ermöglicht als entscheidende Zwischenstufe die Synthese verschiedener natürlicher und modifizierter Sphingolipidderivate über eine C-C-Kupplung mit einem weiteren terminalen Alken unter Verwendung des Grubbs II-Katalysators. Die Kreuzmetathese zwischen **38** und Petadec-1-en liefert geschütztes Sphingosin **36** (Tabelle 1), das nachfolgend zu Sphingosin (**1**) umgesetzt werden kann. Aufgrund der hohen Katalysatortoleranz gegenüber einer Vielzahl an funktionellen Gruppen und den milden Reaktionsbedingungen etablierte sich die Olefinkreuzmetathese zu einer wirkungsvollen und häufig genutzten Methode für die Darstellung von Sphingolipiden und deren funktionalisierten Derivaten. So wurden bereits fluoreszenzmarkierte Sphingosinderivate mit einer endständigen Nitrobenzoxadiazol (NBD)- und Bordipyromethen (BODIPY)-Einheit für lichtmikroskopische Anwendungen erfolgreich synthetisiert.^[241-244]

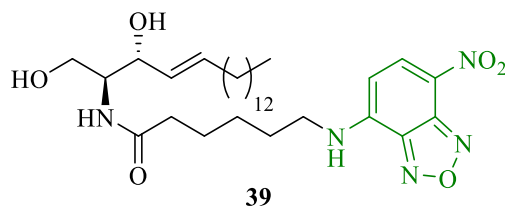
Das Prinzip und die mechanistischen Grundlagen der Olefinkreuzmetathese und Liebeskind-Srogl-Kupplung zum Aufbau des Sphingolipidgrundgerüsts werden aufgrund ihrer Relevanz für diese Doktorarbeit in Kapitel 4.1.1 detaillierter behandelt.

Da Sphingolipide als bioaktive Verbindungen in den letzten Jahrzehnten immer weiter in den Fokus der biologischen und medizinischen Forschung rückten, stieg dementsprechend auch der Bedarf an homogenen und gegebenenfalls gezielt funktionalisierten Substanzen (z. B. isotopen- oder fluoreszenzmarkierte Derivate). Während die ersten Syntheserouten zu Sphingoidbasen zahlreiche Schritte, geringe Ausbeuten und mangelnde Stereokontrolle aufwiesen, sind heute effiziente Methoden mit hoher Enantio- und Diastereoselektivität bekannt.

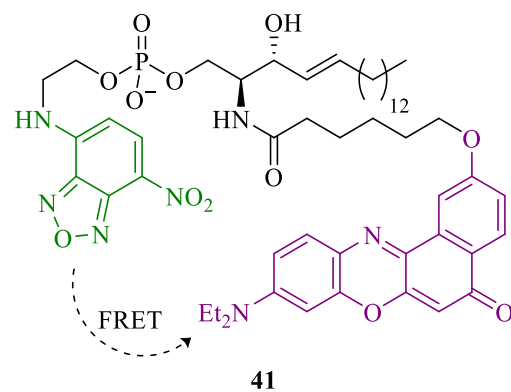
2.2.6 Fluoreszenzmarkierte Sphingolipide

Für die Untersuchung von Sphingolipidtransport, -einbau und -dynamiken sowie von Enzymaktivitäten eignen sich insbesondere farbstoffmodifizierte Lipidderivate in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie. Zu den einfachsten Möglichkeiten fluoreszierende Sphingolipide zu generieren gehört die Amidkupplung der Sphingoidbase (v. a. Sphingosin) mit einer Carbonsäure, die kovalent mit einer Fluorophoreinheit verknüpft ist. Seit der 1985 von Lipsky *et al.* durchgeführten Synthese von NBD-C₆-Ceramid (**39**) wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Sphingolipidanaloga dargestellt.^[245-247] Diese können je nach biologischer Fragestellung in der Position und Art (d. h. Größe, Polarität, Fluoreszenzquantenausbeute, Absorptions- und Emissionswellenlängen) sowie in der Anzahl der Farbstoffgruppen variieren. Eine Auswahl an bekannten fluoreszenzmarkierten Sphingolipiden ist in Abbildung 7 gezeigt.

Seitenkettenfunktionalisierung



Bifunktionalisierung



Grundgerüstkfunktionalisierung

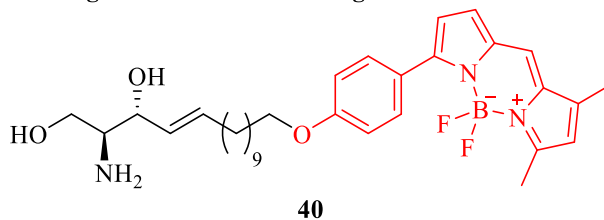


Abbildung 7: Beispiele für bereits bekannte fluoreszenzmarkierte Sphingolipidderivate, bei denen die Farbstoffeinheiten an unterschiedlichen Positionen angebracht sind. Zweifach markierte Lipide ermöglichen u. a. die Untersuchung von Enzymaktivitäten durch FRET-Experimente.

Den Grundstein für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zellulärer Prozesse mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Sphingolipiden legte NBD-C₆-Cer (**39**) (Abbildung 7). Mitte der 80er-Jahre ermöglichte Derivat **39** eine detaillierte Charakterisierung des intrazellulären Transports und Metabolismus von Ceramid unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie.^[248] Aufgrund der höheren Polarität der NBD-verknüpften *N*-Acylkette im Vergleich zur nativen Hexansäurekette weist NBD-C₆-Cer (**39**) eine erhöhte Wasserlöslichkeit auf, wodurch dessen Anwendung in biologischen Systemen vereinfacht wird. Lipski *et al.* zeigten, dass eine kurze Inkubations-

zeit von Lungenfibroblasten mit **39** zu einer Fluoreszenzmarkierung der Mitochondrien, des ER und der Kernmembran führt, während nach einer längeren Inkubationszeit bei 37 °C der Golgi-Apparat sowie die Plasmamembran angefärbt werden. Das fluoreszenzmarkierte Ceramid wird wie das natürliche Gegenstück zu Glycosphingolipiden und Sphingomyelin metabolisiert.^[249] NBD-C₆-Ceramid (**39**) entwickelte sich rasch zum Standard für die Sphingolipidvisualisierung in Zellen und lieferte im Rahmen der zahlreichen durchgeführten Experimente auch die Grundlage für die *Lipid Raft*-Hypothese.^[250-252] Bis heute wird das NBD-funktionalisierte C₆-Ceramid als Golgi-Marker in fixierten und lebenden Zellen eingesetzt.^[245,253-256] Des Weiteren eignet sich Verbindung **39** als nicht-radioaktiv markiertes Substrat für die Enzymaktivitätsmessung von Ceramidkinase, Sphingomyelinsynthase und Ceramidglucosyltransferase.^[257-259]

Anfang der 90er Jahre entwickelten Pagano *et al.* ein BODIPY-modifiziertes C₅-Ceramid, das die Fluorophormarkierung ebenfalls in ω -Position der Seitenkette trägt.^[260] Dieses Analogon zeichnet sich durch einzigartige spektrale Eigenschaften und einer höheren Photostabilität im Vergleich zum NBD-Derivat **39** aus. Die BODIPY-Einheit ermöglicht außerdem eine Unterscheidung zwischen Membranregionen mit hoher und geringer Konzentration des markierten Ceramids.^[261] Da die BODIPY-Gruppe im Gegensatz zum NBD-Rest insgesamt relativ unpolar und elektrisch neutral ist, wird das natürliche Pendant eher durch das entsprechende BODIPY-Analogon repräsentiert.^[261,262] Das kommerziell erhältliche BODIPY-C₅-Ceramid (auch unter der Abkürzung C₅-DMB-Cer bekannt) fand als Golgi-Marker bereits in vielen biologischen Experimenten Anwendung.^[263,264] Weitere Einsatzbeispiele sind z. B. die Charakterisierung von Exosomen-Subpopulationen, Messung der Flip-Flop-Bewegung innerhalb vesikulärer Lipiddoppelmembranen und die Untersuchung von CERT bei bakteriellen Infektionen.^[265-267]

Die Entwicklung selektiver und milder Synthesemethoden für Sphingolipide (Kapitel 2.2.5) ermöglichte das Einbringen empfindlicher Fluorophoreinheiten in das Grundgerüst. Beispielsweise stellte die Gruppe um Peter Nussbaumer 2004 ausgehend von Garner-Aldehyd (**25**) verschiedene NBD-, Pyren- und Dansyl-funktionalisierte Sphingosinderivate dar, die erstmals einen zellfreien und nicht-radioaktiven Assay zur Untersuchung der Sphingosinkinaseaktivität erlaubten.^[268] Wenige Jahre später wurde von derselben Gruppe das Substratspektrum um ein BODIPY-modifiziertes Sphingosin erweitert, welches durch eine Olefinkreuzmetathese als Schlüsselschritt synthetisiert wurde.^[242] In Anlehnung an diese Vorarbeiten wurde 2012 von Kim *et al.* ein weiteres BODIPY-Sphingosin **40** (Abbildung 7) über eine Olefinkreuzmetathese zwischen Garner-Allylkohol und dem ω -Alkenyl-BODIPY-Fluorophor dargestellt. Dieses Analog besitzt deutliche Vorteile gegenüber den vorherigen fluoreszenzmarkierten Sphingosin-derivaten. Zum einen ist keine Anregung mit UV-Licht nötig, da das Anregungsmaximum bei

540 nm liegt und zum anderen überlagert die Emission nicht mit der von grün fluoreszierendem Protein (GFP). Verbindung **40** eignet sich daher optimal für die Untersuchung von Sphingolipiddynamiken in lebenden Zellen.^[243]

Heute ist eine große Anzahl an verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sphingolipidderivaten bekannt, darunter einfache Sphingoidbasen wie Sphingosin oder Sphinganin und komplexe Lipide wie Ceramid, Sphingomyelin oder Glycosphingolipide. Neben den bereits erwähnten NBD-, BODIPY-, Pyren-, und Dansyl-Gruppen werden auch lipophile Nilrot-Einheiten für die Fluoreszenzmarkierung im Grundgerüst oder in der *N*-Acylkette eingefügt.^[234] Ein Beispiel ist das zweifach modifizierte Sphingomyelinanalogon **41** (Abbildung 7), das die Nilrot-Gruppe am Ende der C₆-Seitenkette trägt. Der zusätzliche NBD-Rest am Lipidkopf ermöglicht einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und in Folge die Aktivitätsmessung der humanen sauren Sphingomyelinase (ASM) mittels Fluoreszenzspektroskopie sowie Zwei-Photonen-Anregungsmikroskopie in lebenden Zellen.^[269,270] Weitere sphingolipidbasierte FRET-Sonden finden zur Untersuchung der Sphingomyelinase- und Ceramidaseaktivität Einsatz.^[271]

Im Allgemeinen sollten relativ kleine Biomoleküle wie Sphingolipide mit sterisch anspruchsvoller Fluorophoreinheit für zelluläre Experimente kritisch betrachtet werden, da sie aufgrund der veränderten Größe und Polarität nach externer Zugabe zum biologischen System möglicherweise nicht wie das natürliche Pendant eingebaut werden und die Membranarchitektur stören. Nach Wang *et al.* sind die Derivate NBD-C₆-Ceramid (**39**) (Abbildung 7) und BODIPY-C₅-Ceramid für eine Untersuchung von sphingolipidangereicherten Membrandomänen ungeeignet, da deren Affinitäten zu den anderen *Raft*-bildenden Lipiden (Cholesterol, Phosphatidylcholin) stark von den Affinitäten strukturell gering veränderter Ceramide abweicht.^[272] Des Weiteren zeigt NBD-C₆-Ceramid (**39**) bei bestimmten Bedingungen und Konzentrationen eine erhöhte Zytotoxizität, wodurch dessen Anwendung eingeschränkt ist.^[273] Collenburg *et al.* zeigten 2016, dass die Behandlung mit 25 μM des NBD-Sphingolipids bereits nach zehn Minuten zum Tod von Jurkat- und primären T-Zellen führt, während dies für azidfunktionalisierte Ceramide nicht beobachtet wurde. Selbst bei einer geringeren NBD-C₆-Cer-Konzentration von 5 μM wurden nach längerer Inkubationszeit morphologische Veränderungen mit Verlust der Zellintegrität festgestellt.^[274]

Eine alternative Herangehensweise für die Darstellung von fluoreszierenden Sphingolipiden mit minimaler struktureller Änderung und geringerer Toxizität ist die Einführung konjugierter C-C-Doppelbindungen im Grundgerüst oder in der *N*-acylierten Fettsäure.^[246,252,275-278] Die optisch aktiven π -Systeme der hydrophoben Ketten führen jedoch zu einer stark erhöhten

Starrheit und folglich, wie auch bei sterisch anspruchsvollen Farbstoffmodifikationen, zu einem unnatürlichen Verhalten der Membranlipide.^[279] Außerdem sind die Fluoreszenzeigenschaften und Photostabilität der Polyeneinheiten denen von etablierten Fluoreszenzfarbstoffen deutlich unterlegen.

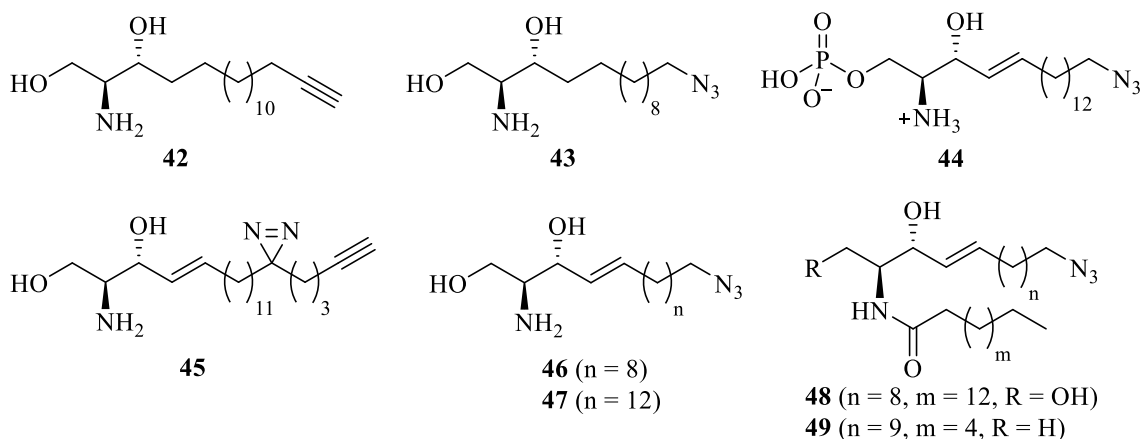
Eine überaus wirkungsvolle Methode zur schnellen und selektiven Einführung von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen mit hoher Sensitivität und Photostabilität sowie variablen Absorptions- und Emissionseigenschaften am Sphingolipid zu einem definierten Zeitpunkt stellt das Prinzip der Click-Chemie dar (Kapitel 2.1). Die sterisch wenig anspruchsvollen Modifikationen der bioorthogonal funktionalisierten Sphingolipidderivate erlauben einen möglichst naturgetreuen Einbau und Transport des Biomoleküls über einen längeren Zeitraum ohne Interaktion mit dem biologischen System.

2.2.7 Bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipide

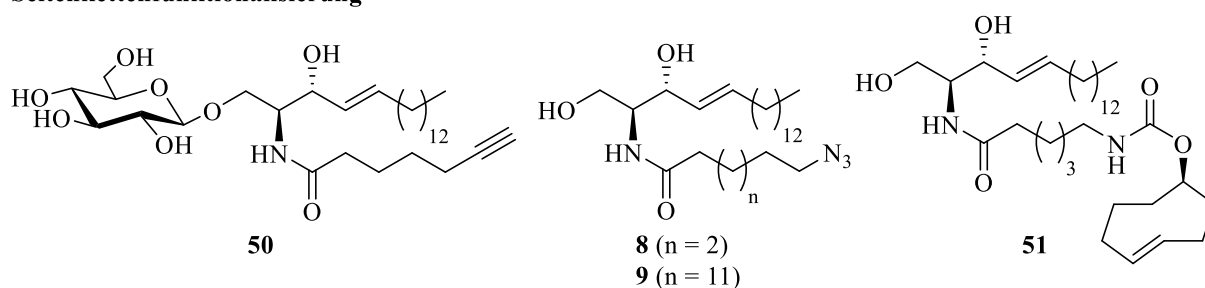
Die Modularität der bioorthogonalen Konjugationsmethoden ermöglicht das Anbringen unterschiedlichster Reporter-moleküle wie Fluorophore für die Fluoreszenzmikroskopie oder Biotin für die Affinitätschromatographie. Des Weiteren ist nach dem Baukastenprinzip der schnelle und einfache Aufbau einer umfassenden Bibliothek von Sphingolipidderivaten möglich, was für biologische und pharmakologische *Screenings* (z. B. Bestimmung und Vergleich der antibakteriellen oder tumorsuppressiven Wirkung der Derivate) interessant ist. Darüber hinaus können azid- und alkinmodifizierte Sphingolipide als Substrate von markierten Metaboliten dienen (vorläuferdirigierte Biosynthese) und dadurch zur Untersuchung des Sphingolipidstoffwechsels eingesetzt werden. Durch die Einführung der bioorthogonalen Gruppe wird das Molekulargewicht im Vergleich zum natürlichen Lipid minimal verändert, sodass deren Unterscheidung mittels Massenspektrometrie durchführbar ist. Bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipide sind somit attraktive Alternativen zu isotopenmarkierten oder gar radioaktiven Sphingolipidsonden. Je nach Anwendung und biologischer Fragestellung ist – analog zu den fluoreszenzmarkierten Sphingolipidderivaten (Kapitel 2.2.6) – die Position der synthetisch eingeführten funktionellen Gruppe variabel. Diese kann im Sphingolipidgrundgerüst, in der *N*-acylierten Fettsäurekette oder an der Kopfgruppe eingeführt werden.^[19,280]

Eine Auswahl an bekannten bioorthogonal funktionalisierten Sphingolipidanaloga ist in der nachfolgenden Abbildung 8 gezeigt.

Grundgerüstfunktionalisierung



Seitenkettenfunktionalisierung



Kopfgruppenfunktionalisierung

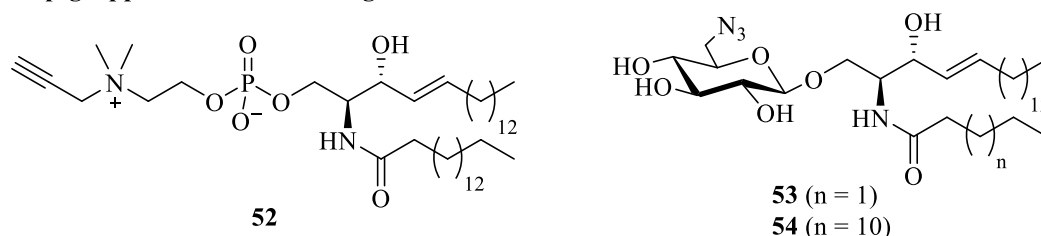


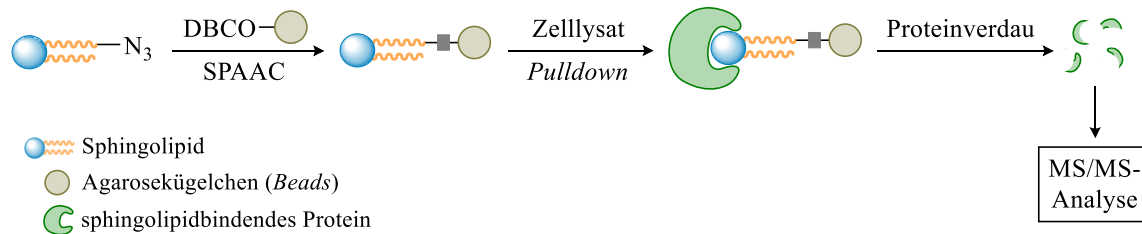
Abbildung 8: Beispiele für bekannte clickbare Sphingolipidderivate, bei denen die bioorthogonalen Funktionen (Alkin, Azid oder Alken) an unterschiedlichen Stellen des Lipids angebracht sind. Die Synthesen der ω -Azidoceramide **8** und **9** (Tim Walter, Dissertation)^[281], des ω -N₃-Sphingosins (**47**) (Julian Fink, Masterarbeit)^[282] und des ω -N₃-SIP (**44**) (Christine Sternstein, Masterarbeit)^[283] wurden in unserer Arbeitsgruppe entwickelt.

Das ω -alkinmodifizierte Sphinganinanalogen **42** wurde 2013 von Gaebler *et al.* ausgehend von Garner-Aldehyd (**25**) synthetisiert.^[284] Die terminale C-C-Dreifachbindung wurde über zwei Schritte eingeführt: Oxidation einer endständigen Alkoholgruppe zur Aldehydfunktion mittels Pyridiniumchlorochromat (PCC) und anschließende Umwandlung zum Alkin mit dem Ohira-Bestmann-Reagenz.^[285,286] Sphinganinderivat **42** kann im Rahmen eines *in vitro*-Enzymassays als Substrat für die Aktivitätsmessung von Ceramidsynthasen dienen. Gaebler *et al.* inkubierten **42** mit unterschiedlich langen Fettsäure-CoA in Gegenwart von Mäusemikrosomen, die CerS enthalten und bestimmten daraufhin die Michaelis-Menten-Kinetik des Alkinsubstrats. Hierfür wurden die Sphingolipide nach der Inkubation extrahiert und dünnschichtchromatographisch

getrennt. Die von CerS gebildeten alkinmodifizierten Dihydroceramid (dhCer)-Spezies wurden schließlich über CuAAC mit einem Azido-Cumarin-Farbstoff konjugiert und mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion quantitativ analysiert.^[287] 2016 demonstrierte dieselbe Gruppe, dass sich ω -Alkinsphingarin **42**, aufgrund der sensitiven mikroskopischen Detektion nach der Click-Konjugation mit azidfunktionalisierten Cyanin 5 (Cy5)- oder BODIPY-Fluorophoren, für Colokalisationsexperimente mit fluoreszenzmarkierten Proteinen in fixierten Zellen eignet.^[288] Das alkinmarkierte Sphingarinanalogon **42** (Abbildung 8) wurde 2020 von Lee *et al.* genutzt, um die Verstoffwechslung von, mit der Nahrung aufgenommenen, Sphingolipiden durch Darmbakterien in Mäusen nachzuweisen. Es wurde gezeigt, dass Alkin **42** nahezu ausschließlich von sphingolipidproduzierenden Bakterien der Gattung *Bacteroides* und *Prevotella* aufgenommen und zu Dihydroceramiden metabolisiert wird.^[289]

Die Synthese der ω -azidfunktionalisierten C₁₄-Sphingoidbasen **43** und **46** (Abbildung 8) ausgehend von Garner-Aldehyd (**25**) wurde 2015 von Garrido *et al.* publiziert. Beide Sphingolipid-derivate werden von lebenden humanen Magentumorzellen (HGC-27) ohne Beeinträchtigung der zellulären Funktion aufgenommen und analog zu den natürlichen Gegenstücken zu Azido-dihydroceramid, -ceramid, und -sphingomyelin metabolisiert. Die bioorthogonale kupferfreie Click-Reaktion mit verschiedenen DBCO-Markern ermöglicht eine massenspektrometrische Charakterisierung der Azidosphingolipidmetaboliten aus unterschiedlichen Zellpopulationen. Letztere können zuvor durch *Pooling* zu einer Gesamtprobe vereint werden, wodurch die Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometriekopplung (HPLC/MS) vereinfacht und verkürzt wird.^[34]

Schulte-Zweckel *et al.* nutzten 2018 das Azidosphingosinderivat **46** als synthetische Vorstufe von ω -N₃-C₁₆-Ceramid (**48**) (Abbildung 8). Die Amidkupplung des Amins wurde mit Palmitinsäurechlorid und Natriumacetat in wässrigem Tetrahydrofuran (THF) durchgeführt.^[290] Das clickbare Ceramid **48** dient in Kombination mit einem Protein-Array und MS-basierter Proteomik als Werkzeug für die Detektion und Identifizierung ceramidbindender Proteine. Enzyme und Proteine, die direkt mit bioaktiven Sphingolipiden wie Apoptose-induzierendem Ceramid interagieren, stellen neue potenzielle therapeutische Ziele dar. Für die Aufklärung von Sphingolipid-Protein-Wechselwirkungen wird ω -N₃-C₁₆-Ceramid (**48**) zunächst über SPAAC kovalent an die Oberfläche von DBCO-dekorierten Agarosekügelchen gebunden. In einem *Pulldown*-Assay werden die ceramidmodifizierten *Beads* mit Zelllysat inkubiert und anschließend mit Pufferlösung gewaschen, um nicht-gebundene Proteine zu entfernen. Die gebundenen Proteine werden schließlich durch verschiedene Peptidasen verdaut und die Fragmente mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) analysiert (Schema 8).



Schema 8: Identifizierung von Sphingolipid-Protein-Komplexen durch *Pull-down*-Assays mit ω -N₃-Ceramiden.

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von sphingolipidbindenden Proteinen ist die Verwendung bifunktionaler Sphingolipidderivate, die sowohl eine bioorthogonale Gruppe als auch eine photoaktivierbare Diazirinfunktion besitzen. Letztere setzt nach der Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda \approx 355$ nm) elementaren Stickstoff und eine hochreaktive Carbenspezies frei, die unter Ausbildung einer kovalenten Bindung schnell mit benachbarten Makromolekülen wie Proteinen reagiert. Diese sogenannte *Photocrosslinking*-Methode findet häufig Anwendung bei der Untersuchung von Protein-Substrat-Wechselwirkungen.^[291] Dabei wird folgende zwei-stufige Strategie genutzt: kovalente Bindungsbildung zwischen der bifunktionalen Lipidsonde und dem interagierenden Protein in unmittelbarer Umgebung über die reaktive Carbenspezies nach UV-Bestrahlung, gefolgt von der Click-Reaktion mit einem Fluorophor oder Biotin für die Detektion des gebildeten Lipid-Protein-Komplexes durch Fluoreszenzmikroskopie, In-Gel-Fluoreszenz oder Massenspektrometrie.^[280,292] Das photoaktivierbare und clickbare Sphingosinderivat **45** (Abbildung 8), abgekürzt pacSph, wurde 2015 von Haberkant *et al.* synthetisiert und ermöglichte die Identifikation von über 180 neuen sphingolipidbindenden Proteinen in S1P-Lyase-defizienten Fibroblasten aus Mausembryonen.^[293] Die Kombination aus *Photocrosslinking* und Click-Chemie zur Untersuchung von Sphingolipid-Protein-Interaktionen wurde von der Gruppe um Joost C. M. Holthuis auf Ceramide übertragen. Das entsprechende pacCer bzw. pacFACer wurde über eine Amidkupplung von Sphingosin (**1**) mit einer diazirin- sowie alkinmodifizierten C₁₅-Fettsäure (pacFA) synthetisiert und bereits in zahlreichen Studien eingesetzt.^[18,294-299]

Des Weiteren stellt das Sphingosinderivat **45** (Abbildung 8) eine Vorstufe von trifunktionalen Sphingolipidsonden dar. Durch die Einführung einer photoabspaltbaren Cumarin-Schutzgruppe an der Aminogruppe von **45** entwickelten Höglinger *et al.* 2016 eine multifunktionale Käfigverbindung, die erst durch Bestrahlung mit Wellenlängen über 400 nm gezielt in die bioaktive Sphingosinspezies umgewandelt wird (*Uncaging*). Das dreifach modifizierte Lipid ermöglicht die Untersuchung des Sphingolipidmetabolismus, der subzellulären Sphingolipidlokalisation sowie von Sphingolipid-Protein-Wechselwirkungen.^[300,301]

Eine alternative Methode zur raumzeitlichen Aktivierung der biologischen Lipidfunktion stellt die Verwendung von photoschaltbaren Sphingolipidderivaten mit einer Azobenzoleinheit dar. Die Anfang 2021 publizierte Studie von Morstein *et al.* demonstriert den Einsatz von kurz-kettigen photoschaltbaren und alkinmodifizierten Ceramiden (scaCers) in der lichtabhängigen Kontrolle über die signalvermittelte Apoptose sowie über die Metabolisierung durch Sphingomyelinsynthase 2 (SMS2).^[302]

Das ω -Azidosphingosin (**47**) und die S1P-Spezies **44** (Abbildung 8) wurden erstmals in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich synthetisiert.^[282,283] Im Gegensatz zu den von Garrido *et al.* vorgestellten ω -N₃-C₁₄-Sphingolipidderivaten wurden die Verbindungen **47** und **44** über eine Olefin-kreuzmetathese als Schlüsselschritt zum Aufbau des, in Säugetieren hauptsächlich vertretenen, C₁₈-Grundgerüsts ohne Verwendung von krebserregendem HMPA erhalten. Die Synthese und Anwendung des Sphingosinanalogs **47** sind Teil dieser Arbeit und werden in Kapitel 4.1.3.4 beschrieben.

Für die spezifische Detektion und Verfolgung der Aktivität der sauren Ceramidase in lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie entwickelte die Gruppe um Gemma Fabrias 2020 das azid-funktionalisierte 1-Desoxyceramidderivat **49** (Abbildung 8).^[303] Dieses wird in Gegenwart von neutraler und basischer Ceramidasen ausschließlich von der sauren Ceramidase gespalten und kann aufgrund der fehlenden primären Hydroxygruppe nicht weiter zu komplexeren Sphingolipiden wie Sphingomyelin oder Glycosphingolipide metabolisiert werden.

Im Vergleich zur Grundgerüstfunktionalisierung stellt die Modifikation der Seitenkette *via* Amidkupplung mit einer entsprechenden Carbonsäure eine wesentlich einfachere Methode zur Generierung bioorthogonal funktionalisierter Ceramide und komplexerer Sphingolipide dar. Beispielsweise wurde das Glucosylceramidderivat **50** (Abbildung 8) von Dauner *et al.* über insgesamt sechs Schritte ausgehend von Sphingosin (**1**) synthetisiert, wobei im ersten Schritt die alkinfunktionalisierte *N*-Acylkette eingeführt wurde. Das Alkin-Cerebrosid **50** ermöglicht nach dem Einbau in menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) die Markierung der Plasmamembran und intrazellulärer Membranen durch CuAAC mit komplementären Azido-Cumarin- und -Rhodamin-Fluorophoren. Durch die Verwendung eines Cu(I)-stabilisierenden Liganden ist die Click-Reaktion mit Alkin **50** für Lebendzelleexperimente geeignet.^[304]

Sphingolipide mit Azidfunktion eignen sich dagegen für kupferfreie SPAAC (Kapitel 2.1.2) und ebenfalls für Studien an lebenden Zellen. Das kurz-kettige N₃-Ceramid **8** und das lang-kettige Analogon **9** (Abbildung 8) sowie deren Konstitutionsisomere mit der Azidgruppe in α -Position der Seitenkette wurden erstmals von Tim Walter synthetisiert.^[190]

Insbesondere das Azido-C₆-Ceramid **8** zeigte in der 2015 von Collenburg *et al.* durchgeführten Studie eine hohe Einbaurate von etwa 70 % innerhalb von 25 Minuten in Jurkat-Zellen und humane primäre T-Zellen, während das langkettige Derivat **9** weniger effizient eingebaut wird. Verbindung **8** ermöglicht durch SPAAC mit den nicht-membranpermeablen Fluorophoren DBCO-Sulfo-Cy5 und DIBO-488 die Visualisierung der Ceramidumverteilung und der Bildung ceramidangereicherter Mikrodomänen während der T-Zellaktivierung. Im Gegensatz zu NBD-C₆-Cer (**39**) (Abbildung 7) weist die Azidverbindung **8** keine Toxizität auf, sodass diese ein optimales molekulares Werkzeug für Lipiddynamikstudien *in vivo* darstellt.^[274] In einem weiteren Projekt von Walter *et al.* wurden die α - und ω -azidfunktionalisierten Ceramidanaloga unterschiedlicher Kettenlänge hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Cyclooctinen, d. h. hinsichtlich der Zugänglichkeit der Azidfunktion nach Einbau in die Zellmembran, verglichen.^[281] Fluoreszenzanisotropie-Messungen und Löschungsexperimente deuten darauf hin, dass die Azidgruppen der C₁₆-Ceramide unabhängig von ihrer Position die meiste Zeit nicht für die Click-Konjugation zugänglich sind. Die kurzkettigen Varianten, darunter ω -N₃-C₆-Ceramid (**8**) (Abbildung 8), lassen sich hingegen effektiv *in vivo* konjugieren, da die *N*-Acylkette leichter aus der Membran herausragen kann.^[190] Des Weiteren wurden die Azidoceramidanaloga auf ihre antibakterielle Wirkung gegenüber gramnegative Erreger getestet. Den stärksten bakteriziden Effekt auf *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* zeigte das, gegenüber humane Wirtszellen nicht-toxische, ω -N₃-C₆-Cer (**8**) (Kapitel 2.2.4).^[189] Dieses Sphingolipidderivat stellt einen vielversprechenden Wirkstoffkandidat gegen mikrobielle Pathogene dar und kann zusätzlich für Ceramidlokalisationsstudien mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie (*d*STORM) verwendet werden.

Die Synthese und weitere Anwendungsmöglichkeiten der Ceramidderivate **8** und **9** sind Teil dieser Arbeit und werden in Kapitel 4.1.3.1 beschrieben.

Das 2014 von Erdmann *et al.* vorgestellte TCO-funktionalisierte Ceramid **51** (Abbildung 8) eignet sich ebenfalls für hochauflösende Mikroskopieaufnahmen von Zellen.^[85,305] Die schnell ablaufende und kupferfreie iEDDA (Kapitel 2.1.3) mit einem Silicium-Rhodamin-Tetrazin-Farbstoff (SiR-Tz), der im nahen Infrarotbereich emittiert, führt zu einem sehr photostabilen Konjugationsprodukt und ermöglicht die Visualisierung des Golgi-Apparats *in vivo*. Wird als Tetrazinreaktant ein spontan blinkender und membranpermeabler HMSiR-Farbstoff gewählt, ist die Untersuchung des endoplasmatischen Retikulums mit einer räumlichen Auflösung von unter 50 Nanometern in 2D sowie die 3D-Bildgebung lebender Zellen über einen Zeitraum von 15 Minuten möglich.^[306,307]

Ein Ceramidderivat, dessen *N*-acylierte Seitenkette mit einer terminalen C-C-Dreifachbindung modifiziert ist, wurde von Kol *et al.* in einem zellfreien Sphingomyelinase (SMase)-Aktivitätsassay eingesetzt.^[308] Darüber hinaus ist das 2009 von Sandbohr *et al.* vorgestellte Analogon **52** (Abbildung 8) mit einer Alkingruppe an der Cholineinheit ebenfalls ein geeignetes Werkzeug für die SMase-Aktivitätsmessung. Der Versuch alternativ eine Azidfunktion am Kopfmotiv einzuführen scheiterte damals aufgrund der Instabilität des Nukleophils *N,N*-Dimethylazidoethylamin.^[309] Heute ist das entsprechende Azidosphingomyelinderivat kommerziell erhältlich.

Wie für Alkincerebrosid **50** beschrieben, eignet sich auch das C₄-Glucosylceramid analog **53** (Abbildung 8) mit Azidgruppe an C-6-Position der Kohlenhydrateinheit für die Visualisierung der Plasmamembran von lebenden HEK-Zellen. Derivate mit längeren *N*-Acylketten wie **54** werden unter gleichen Bedingungen nicht in die Zellmembranen eingebaut, was vermutlich auf eine begrenzte Löslichkeit der Glycosphingolipide zurückzuführen ist.^[304]

In der 2020 von Daughtry *et al.* veröffentlichten Arbeit wurde ein chemoenzymatischer Ansatz zur Synthese eines azidfunktionalisierten Galactosylceramid analogs verfolgt. Hierfür wurde die primäre Hydroxygruppe von C₁₇-Ceramid unter Einsatz von UDP-aktivierter 6-Desoxyazidogalactose (UDP-6AzGal) *in vitro* durch Ceramidgalactosyltransferase glykosyliert.^[310] Mit Hilfe bioorthogonal funktionalisierter Kohlenhydratvorstufen können Glykane in lebenden Zellen für Click-Reaktionen zugänglich gemacht und visualisiert werden (*Glycoengineering*-Methode).^[311] Diese Herangehensweise ist für die Markierung von komplexen Glycosphingolipiden wie Ganglioside wesentlich einfacher als die klassisch-chemische Synthese und erlaubt fluoreszenzmikroskopische Studien der Glykokalyx. Letztere spielt als „Kohlenhydratschicht“ der Plasmamembran bei Zell-Zell- und Zell-Pathogen-Interaktionen eine entscheidende Rolle.

Zellmembranen entwickelten sich im Laufe der Evolution zu hochkomplexen, dynamischen Strukturen, die schnell und selektiv auf unterschiedliche Signale von innerhalb und außerhalb der Zelle reagieren müssen. Wie sie dies durch feine Änderungen ihrer Struktur, Dynamik und Organisation ermöglichen, wird Forscher noch einige Zeit faszinieren und herausfordern. Zukünftige Untersuchungen an Zellmembranen sollen neue therapeutische Ansätze liefern, die Dysfunktionen bei Transport, Signalübertragung, Biosynthese und anderen Membranfunktionen korrigieren und somit die Gesundheit verbessern.^[312] Für die Untersuchung von bestimmten Molekülen innerhalb oder auf der Zelle eignen sich insbesondere spezifische bioorthogonale Markierungsmethoden, bei denen die biologischen Prozesse nicht gestört werden.

3 Zielsetzung

Zelluläre Prozesse, die eine Vielzahl an biochemischen Reaktionen und Signalwegen umfassen, müssen für eine ordnungsgemäße Zellfunktion streng reguliert sein. Mehr als 8700 Reaktionen und 16000 Metaboliten sind bereits in der Kyoto-Enzyklopädie der Gene und Genome hinterlegt.^[313] Die Störung eines Elements dieser hochkomplexen Stoffwechselwege kann zu unterschiedlichen Krankheiten führen, sodass die detaillierte Untersuchung biologischer Prozesse von großem medizinischen Interesse ist. Speziell dem Sphingolipidmetabolismus wird eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer Wirkstoffe zugeschrieben, da bioaktive Sphingolipide entscheidend für Zellwachstum, -überleben und -tod sind. Für die Entwicklung neuartiger Therapeutika und Diagnosemethoden sind nicht nur sehr präzise Mikroskopie- und Analysetechniken nötig, sondern auch chemisch synthetisierte molekulare Werkzeuge, die z. B. als MS-Standardsubstanzen dienen und bioorthogonale Markierungsreaktionen *in vivo* erlauben.

Das Hauptaugenmerk dieser Doktorarbeit lag daher auf der Totalsynthese von Sphingoidbasen, Ceramiden und Sphingolipidanaloga ausgehend von der Aminosäure L-Serin nach einem Baukastenprinzip, bei dem wichtige Zwischenstufen für unterschiedliche Syntheserouten eingesetzt werden können. Sowohl natürlich vorkommende, nicht funktionalisierte Sphingolipide als auch maßgeschneiderte funktionalisierte Derivate sollten für diverse mikroskopische und massenspektrometrische Analysen dargestellt werden, wobei folgende Aspekte variiert werden sollten:

- Kettenlänge und Funktionalität der *N*-acylierten Fettsäuren, um die biochemischen und physikalischen Eigenschaften sowie die potenziell antibakterielle Wirkung der Lipide zu verändern und um Ceramide für die Expansionsmikroskopie nutzbar zu machen
- Sättigungsgrad der Sphingoidbasen, um verschiedene Metaboliten nachzuahmen
- Art der bioorthogonalen Funktionalität, um eine breite Anwendbarkeit der Proben zu gewährleisten – generell sollten bevorzugt funktionelle Gruppen eingeführt werden, die kupferfreie Click-Reaktionen und somit Lebendzelluntersuchungen zulassen
- Position der bioorthogonalen Funktionalität, um z. B. bestimmte Stoffwechselwege zu erlauben oder gezielt zu blockieren

Alle synthetisierten Verbindungen sollten nach der Isolierung mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie vollständig charakterisiert und anschließend in verschiedenen Projekten innerhalb der Forschergruppe FOR2123 (*Sphingolipid dynamics in infection control*) sowie des Graduiertenkollegs GRK2581 (*Metabolism, topology and compartmentalization of membrane proximal lipid and signaling components in infection*) eingesetzt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

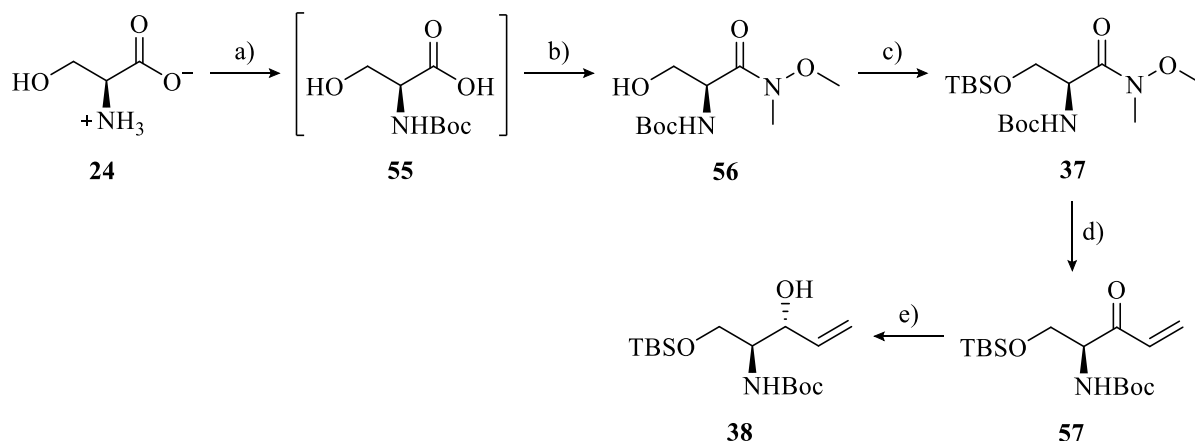
4.1 Sphingolipide und deren funktionalisierte Derivate zur Untersuchung biologischer Prozesse

Sphingolipide stellen einen wesentlichen Bestandteil eukaryotischer Zellmembranen dar, in denen sie allgemein strukturgebende Funktionen besitzen. Darüber hinaus werden beispielsweise denen sich im Gleichgewicht befindenden Metaboliten Ceramid, Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat bioaktive Eigenschaften zugeschrieben.^[120] Als Signalmoleküle sind diese Lipide an wichtigen Regulationsmechanismen zellulärer Prozesse wie Wachstum, Überleben oder Zelltod beteiligt.^[22] Störungen und Defekte des metabolischen Sphingolipidgleichgewichts stehen im Zusammenhang mit einer Vielzahl an Krankheiten wie Krebs, chronischen Entzündungen oder lysosomalen Speicherkrankheiten.^[143,144] Die genaue Untersuchung des hochkomplexen Sphingolipidmetabolismus ist für die Entwicklung neuartiger Therapeutika, die auf den assoziierten Enzymen oder Rezeptoren basieren, von großer medizinischer Bedeutung. Einen wichtigen Beitrag dazu liefert die chemische Synthese definierter Sphingolipidspezies und deren Derivate, die unter anderem als Standardsubstanzen oder metabolische Vorläufermoleküle bei massenspektrometrischen Analysen Einsatz finden.^[34,314] Die Konjugation mit einem Fluorophor ermöglicht zusätzlich mikroskopische Untersuchungen *in vivo*.^[18,261] Einige Synthesestrategien zum Aufbau von Sphingoidbasen orientieren sich an der *de novo*-Biosynthese mit L-Serin als chirale Ausgangsverbindung. Die Herausforderung besteht in der Knüpfung des C₁₈-Grundgerüsts mit *E*-konfigurierter C-C-Doppelbindung und der Einführung zweier Stereozentren mit Amino- und Hydroxygruppe in *anti*-Orientierung.

4.1.1 Aufbau des Sphingolipidgrundgerüsts

Die in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten Techniken zum Aufbau von Sphingolipiden sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit bezüglich Ausbeute, Selektivität und Handhabung optimiert und bei Bedarf um weitere Methoden erweitert werden. Eine effiziente Totalsynthese von definierten Sphingolipidspezies als molekulare Werkzeuge sollte zur gezielten Aufklärung biologischer Fragestellungen in verschiedenen Kooperationsprojekten beitragen. Zu Beginn wurde das Sphingolipidgrundgerüst über eine Ruthenium-katalysierte Metathesereaktion des Allylalkohols **38**, welcher das polare Kopfmotiv des Lipids repräsentiert, aufgebaut.

Die Synthese des ungesättigten Alkohols **38** ausgehend von der Aminosäure L-Serin (**24**) wurde in Anlehnung an Pinkert *et al.*, Mina *et al.*, Yamamoto *et al.* und vorangegangene Arbeiten aus unserer Gruppe durchgeführt (Schema 9).^[269,282,283,315-317]



Schema 9: Durchgeführte Synthese des Allylalkohols **38** ausgehend von L-Serin (**24**) über Weinreb-Amid **37**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Boc_2O , NaOH, $\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-Dioxan}$, $0\text{ °C} \rightarrow \text{RT}$, 23 h; b) EDC·HCl, $\text{Me}(\text{MeO})\text{NH}\cdot\text{HCl}$, NMM, DCM, -15 °C , 2.5 h, 86 % (2 Stufen); c) TBSOCl, Imidazol, DMF/DCM, $0\text{ °C} \rightarrow \text{RT}$, 18.5 h, 95 %; d) Vinylmagnesiumbromid, THF, 0 °C , 20 min, 72 %; e) $\text{LiAl}(\text{O}^t\text{Bu})_3\text{H}$, EtOH, -78 °C , 4 h, 88 %.

Säure **24** wurde zur Schützung der Aminofunktion unter wässrig basischen Bedingungen mit einer Lösung aus Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O) in 1,4-Dioxan versetzt. Bei der Aufarbeitung wurde das Gemisch mit Cyclohexan gewaschen, wobei überschüssiges Boc_2O in die organische Phase übergang und die deprotonierte Säure in der wässrigen Phase verblieb. Diese wurde daraufhin angesäuert und zur Isolierung von *N*-Boc-L-Serin (**55**) mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels wurde das erhaltene Rohprodukt in einer Carbodiimid-vermittelten Amidkupplung unter basischen Bedingungen direkt weiter zu Weinreb-Amid **56** umgesetzt, welches mit einer guten Ausbeute von 86 % über zwei Stufen isoliert wurde (Schema 9). Eine säulenchromatographische Reinigung war nicht nötig, da das bei der Amidkupplung entstehende EDC-Harnstoffderivat wasserlöslich ist und durch einfache Extraktion unter leicht sauren Bedingungen abgetrennt werden konnte.^[318]

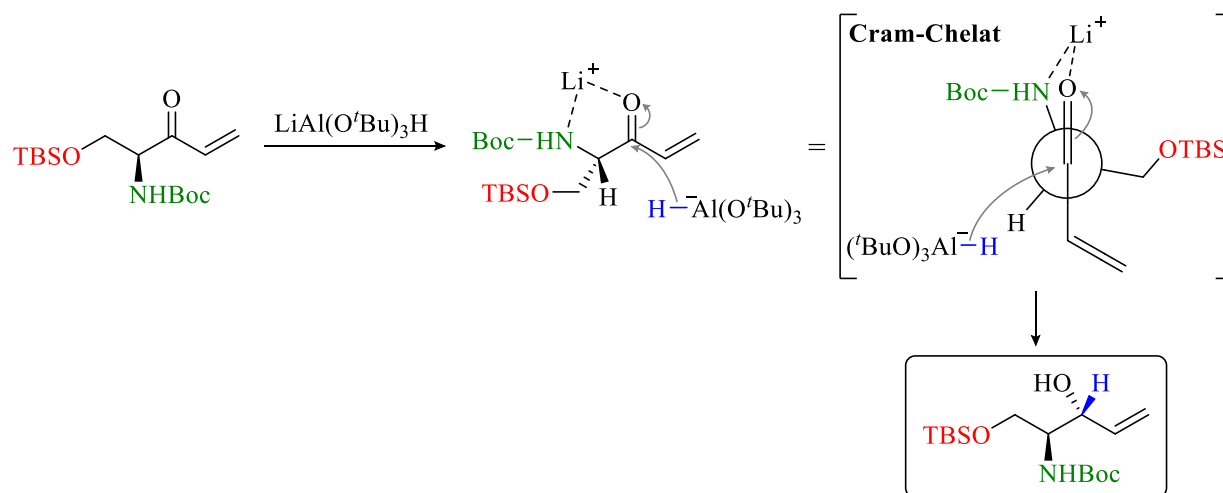
Die Schützung der primären Hydroxygruppe als *tert*-Butyldimethylsilylether erfolgte mit dem entsprechenden Silylchlorid und Imidazol als effektiven Silylgruppenüberträger. Der eingesetzte Heteroaromat dient nicht nur als Base, sondern auch als nukleophiler Katalysator.^[319] Das gewählte Lewis-basische Lösungsmittel *N,N*-Dimethylformamid (DMF) katalysiert die Reaktion zusätzlich.^[320] Das vollständig geschützte Weinreb-Amid **37** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer sehr guten Ausbeute von 95 % erhalten (Schema 9).

Weinreb-Amid **37** stellt eine wichtige Zwischenstufe in der chemischen Synthese von Sphingolipiden oder deren Derivaten dar (Kapitel 2.2.5). Durch Addition einer Grignard-Verbindung wird eine C-C-Bindungsknüpfung unter Ausbildung eines Ketons ermöglicht, was für den Aufbau des Sphingolipidgrundgerüsts von entscheidender Bedeutung ist. Dabei kommt es nach dem nukleophilen Angriff der metallorganischen Verbindung zur Ausbildung eines stabilen fünfgliedrigen Chelatkomplexes, was die Addition eines weiteren Äquivalents des Metallorganyls und somit die Bildung eines tertiären Alkohols verhindert.^[321,322]

Für den geplanten Kreuzmetathese-basierten Aufbau des Sphingolipidgrundgerüsts wurde Amid **37** in trockenem Tetrahydrofuran (THF) mit Vinylmagnesiumbromid versetzt. Bei der wässrigen Aufarbeitung wurde ein Überschuss an Salzsäure eingesetzt, um eine ungewünschte Michael-Addition des abgespalteten Amins unter Bildung eines β -Aminoketons durch dessen Protonierung zu verhindern.^[323,324] Nach der Extraktion mit Essigsäureethylester und säulenchromatographischer Reinigung wurde die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung **57** mit einer Ausbeute von 70 % isoliert (Schema 9).

Zum Aufbau des zweiten Stereozentrums wurde Keton **57** in Ethanol gelöst und innerhalb von vier Stunden portionsweise mit dem Reduktionsmittel Lithiumtri-*tert*-butoxyaluminiumhydrid ($\text{LiAl}(\text{O}^t\text{Bu})_3\text{H}$) versetzt. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen wurde die Temperatur mit einem Aceton/Trockeneis-Bad konstant auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Bei höheren Temperaturen, z. B. durch schnellere Zugabe des Hydrids, kann es neben dem Verlust der Stereoselektivität zur Michael-Addition unter Ausbildung einer gesättigten C-C-Bindung oder zur Entwicklung von Wasserstoff kommen.^[325] Nach vollständigem Umsatz von Keton **57** wurde zur Deaktivierung von überschüssigem Hydrid und zur Protonierung zum Alkohol mit verdünnter Salzsäure aufgearbeitet. Durch Extraktion mit Essigsäureethylester und anschließender säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel wurde der (2*S*,3*R*)-konfigurierte Allylalkohol **38** mit einer guten Ausbeute von 88 % isoliert (Schema 9).

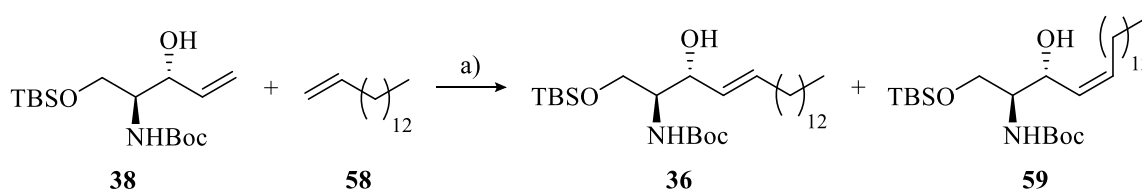
Eine Erklärung für die Stereoselektivität der Reduktion liefert das Chelat-Modell nach Hoffman *et al.*, bei dem das Lithiumkation des eingesetzten Reduktionsmittels sowohl an das Carbonylsauerstoffatom des Ketons als auch an das Stickstoffatom der geschützten Aminogruppe koordiniert (Schema 10).^[325] Diese zweifache Koordination des Metallions führt zu einer *syn*-periplanaren Anordnung der Ketogruppe und des Amins. Infolgedessen kommt es zum nukleophilen Angriff des Hydrids an das Carbonyl-C-Atom des Ketons von der sterisch begünstigten Seite im Bürgi-Dunitz-Winkel (ca. 105°) und zur Bildung des *anti*-Diastereomers.



Schema 10: Reaktionsmechanismus der stereoselektiven Reduktion des *N*-Boc-geschützten Aminoketons **57** über einen Chelatkomplex zum *anti*-1,2-Aminoalkohol **38**.^[325]

Allylalkohol **38** stellt neben Weinreb-Amid **37** eine wichtige Zwischenstufe in der Synthese von Sphingolipiden und deren Derivaten dar, da dieser eine Kreuzmetathesereaktion mit verschiedenen terminalen Olefinen eingehen kann. Durch geeignete Wahl des zugesetzten Alkens sind Sphingoidbasen beispielsweise bezüglich ihrer Kettenlänge oder Funktionalisierung variabel.^[241,315,326-329] Eine bekannte und effiziente Methode für den Aufbau des natürlichen Sphingosingerüsts ist die Übergangsmetallkatalysierte Kupplung von Alkohol **38** mit Pentadec-1-en (**58**) unter Einsatz des Grubbs-Katalysators der 2. Generation (Kapitel 2.2.5, Tabelle 1).

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Synthese des TBS- und Boc-geschützten Sphingosinderivats **36** erfolgte in Anlehnung an Yamamoto *et al.* und vorangegangenen Arbeiten aus unserer Forschungsgruppe (Schema 11).^[241,282,283]



Schema 11: Durchgeführte Synthese des geschützten Sphingolipids **36** mit C₁₈-Grundgerüst ausgehend von Allylalkohol **38** und Pentadec-1-en (**58**) mittels Olefinkreuzmetathese. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Grubbs II-Kat., DCM, 50 °C, 2 h, 70 % (*E*-Konfiguration).

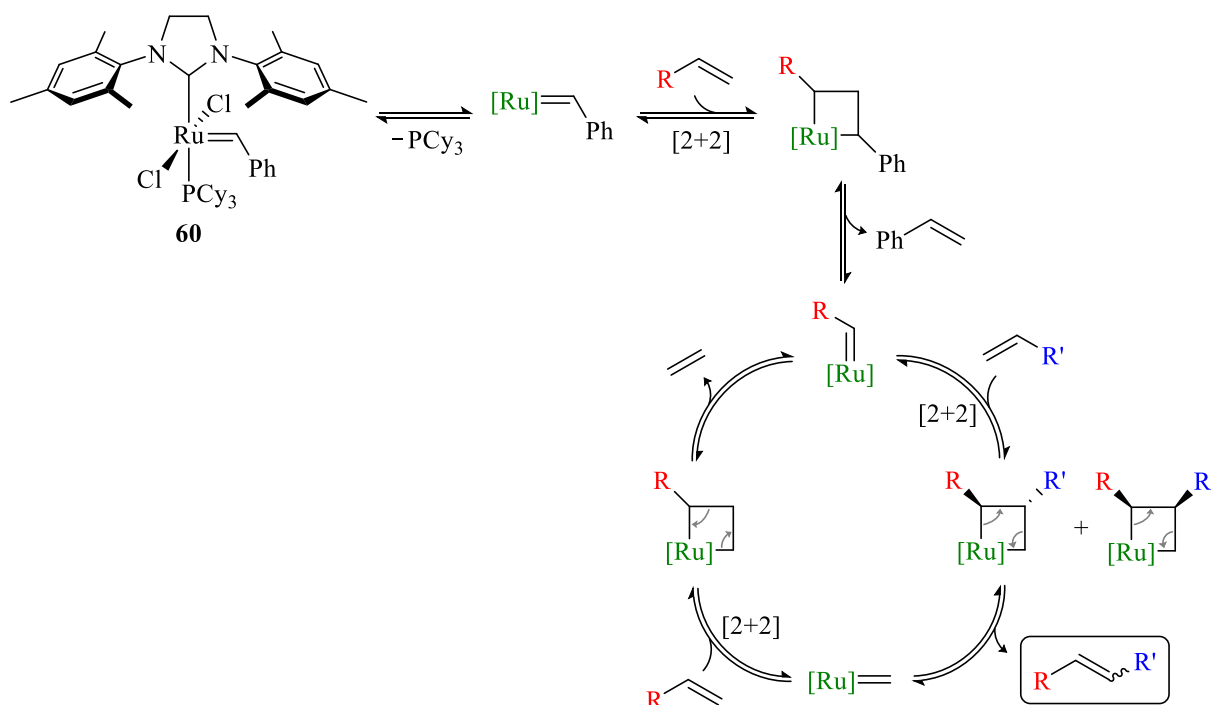
Die Kreuzmetathese des Olefins **38** wurde in Dichlormethan mit 0.03 Äquivalenten des Grubbs II-Katalysators und einem vierfachen Überschuss von **58** durchgeführt (Schema 11). Dieser hohe Überschuss ist Voraussetzung für die Reaktion zwischen den beiden Edukten, da Alken **58** aufgrund der geringen sterischen Abschirmung ein Olefin des Typs I darstellt und leichter zur Homokupplung neigt. Bei Allylkohol **38** handelt es sich durch die sterische Hinderung der Hydroxy- und der beiden Schutzgruppen um ein Olefin des Typs II, welches die Kreuzreaktion mit einem Typ-I-Olefin gegenüber der Homokupplung bevorzugt.^[330]

Die dargestellte Synthesemethode ausgehend von Verbindung **38** nutzt zusätzlich den positiven Einfluss der allylischen Hydroxyfunktion für eine effiziente Katalyse. Der aktivierende Effekt einer Hydroxygruppe in Allylposition bei einer Ru-katalysierten Ringschlussmetathese wurde erstmals 1999 von Hoyer und Zhao beschrieben.^[331] Heute wird die natürliche Affinität des Übergangsmetalls zu Allylchalkogenen bereits zur gezielten Darstellung komplexer Moleküle oder zur Proteinmodifikation genutzt.^[332]

Bei der durchgeführten Synthese zum Aufbau des C₁₈-Lipidrückgrats wurde nach vollständigem Umsatz des Alkohols **38** das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. Da bei dieser Reaktion neben dem thermodynamisch bevorzugten (*E*)-konfigurierten Alken **36** teilweise das (*Z*)-Isomer **59** mit sehr ähnlichem Retentionswert (*R_f*) gebildet wurde, musste die Säulenchromatographie zur Trennung der beiden Isomeren sorgfältig durchgeführt werden. Hierfür stellte sich ein Lösungsmittelgradient bestehend aus Cyclohexan und Essigsäureethylester als hilfreich dar, wobei für die einfache Abtrennung des unpolaren Homokupplungsnebenprodukts zunächst mit reinem Cyclohexan eluiert wurde. Das gewünschte (*E*)-Alken **36** wurde schließlich mit einer Ausbeute von 70 % erfolgreich isoliert (Schema 11).

Im aufgenommenen ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) erscheint das olefinische Proton *H*-4 bei einer chemischen Verschiebung von 5.50 ppm als Dublett von Dubletts von Tripletts und *H*-5 bei 5.75 ppm als Dublett von Tripletts von Dubletts. Die gemeinsame ³*J*-Kopplungskonstante von 15.3 Hz weist auf die *E*-Konfiguration der gebildeten C-C-Doppelbindung hin. Bei einem *Z*-konfigurierten Sphingolipidgrundgerüst ist dagegen eine vicinale Kopplungskonstante von etwa 11 Hz zu erwarten.^[333]

Die Bildung des Isomerengemisches wird durch den Reaktionsmechanismus der Olefinkreuzmetathese nach Chauvin erklärt (Schema 12).^[334-337]

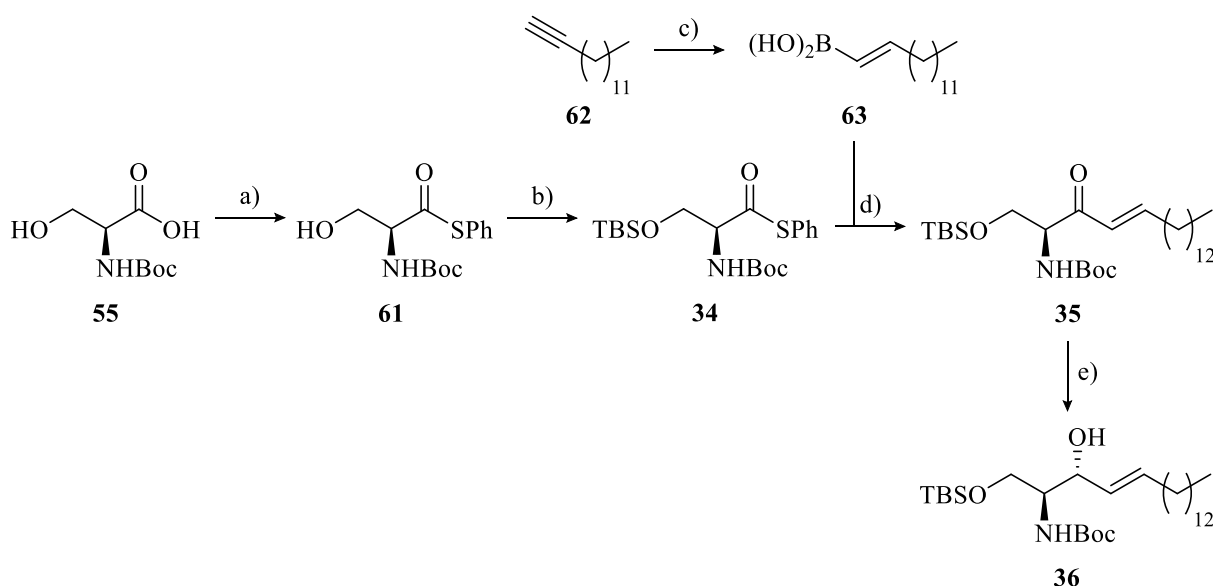


Schema 12: Reaktionsmechanismus der Ruthenium-katalysierten Olefinkreuzmetathese von terminalen Alkenen am Beispiel des Grubbs-Katalysators der zweiten Generation (**60**).^[334-337]

Zunächst findet die geschwindigkeitsbestimmende Dissoziation des Phosphanliganden von **60** unter Bildung eines 14-Elektronenkomplexes statt, welcher in einer [2+2]-Cycloaddition mit einem der terminalen Olefine zu einer Metallacyclobutanspezies reagiert.^[336,338,339] Diese viergliedrige Zwischenstufe wird in einer Cycloreversion unter Abspaltung von Phenylethen geöffnet, wobei ein neuer Rutheniumcarbenkomplex entsteht. Die nachfolgende [2+2]-Cycloaddition mit einem weiteren Alken läuft nicht stereoselektiv ab, sodass die Reste in der gebildeten Metallacyclobutanstufe sowohl in *anti*- als auch in *syn*-Orientierung zueinander vorliegen können.^[340] Erstere ist im Fall der eingesetzten Reaktanden **38** und **58** aufgrund des sterischen Anspruchs der vorhandenen allylischen Hydroxygruppe und den beiden Schutzgruppen an **38** thermodynamisch günstiger und wird somit bevorzugt ausgebildet. Dies führt in der nachfolgenden Cycloreversion zur Ausbildung des gewünschten *E*-konfigurierten Alkens. Da der lineare und flexible Kohlenwasserstoffrest des Pentedec-1-ens jedoch einen relativ geringen sterischen Anspruch aufweist, kommt es in der durchgeführten Synthese zum Aufbau des C₁₈-Sphingolipidgrundgerüsts ebenfalls zur Bildung des ungewünschten *Z*-Isomers. Durch Freisetzung der katalytisch aktiven Rutheniumspezies [Ru]=CH₂ wird anschließend der Metathesezyklus gestartet. Bei den ablaufenden Cycloreversionen wird gasförmiges Ethen abgespalten, was die thermodynamische Triebkraft der Reaktion darstellt.^[341]

Ruthenium-katalysierte Olefinkreuzmetathesen finden aufgrund ihrer einfachen Durchführung, den milden Reaktionsbedingungen und der Toleranz gegenüber einer Vielzahl an funktionellen Gruppen bereits breite Anwendung in der organisch-chemischen Synthese.^[335,342] Für die Entwicklung der Metathesemethode und der dabei eingesetzten Katalysatoren wurden Chauvin, Grubbs und Schrock 2005 mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet.^[343] Die Metathese-reaktion von Allylkohol **38** mit anderen, insbesondere funktionalisierten Alkenen stellt eine geeignete Methode zur Synthese von Sphingolipidderivaten dar.

Die Problematik der geringen *E/Z*-Selektivität bei der Kupplung zweier terminaler Olefine ist Gegenstand der aktuellen Forschung, wobei bisher lediglich *Z*-selektive Ruthenium-, Wolfram- oder Molybdän-basierte Katalysatoren entwickelt wurden.^[340,344-346] Bei der geplanten Synthese von **36** sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit die Bildung des *Z*-konfigurierten Nebenprodukts und die damit einhergehende Schwierigkeiten bei der säulenchromatographischen Reinigung durch die Wahl einer anderen Methode zur selektiven Darstellung von natürlichen Sphingoidbasen verhindert werden. Infolgedessen wurde die Synthese des geschützten Sphingosin-derivats **36** zusätzlich nach Yang und Liebeskind durchgeführt.^[240] Während der ablaufenden C-C-Kreuzkupplung war aufgrund der bereits vorgegebenen *E*-Konfiguration des Boronsäure-reaktanden **63** keine ungewünschte Isomerisierung zu beobachten (Schema 13).



Schema 13: Durchgeführte Synthese des geschützten Sphingolipids **36** ausgehend von *N*-Boc-L-Serin (**55**) über eine Liebeskind-Srogl-Kupplung. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) *Variante 1*: PhSH, EDC·HCl, DMAP, DCM, RT, 2.5 h, 44 %, *Variante 2*: PhSH, DCC, HOBT·H₂O, EtOAc/DCM, RT, 2 h, 65 %; b) TBSCl, DMAP, NMM, DMF, 0 °C→RT, 30 min, 87 %; c) Me₂S·BHBBr₂, DCM, 0 °C→RT, 5.5 h, dann H₂O, Et₂O, 0 °C, 10 min, 62 %, d) Pd₂(dba)₃, CuTC, P(OEt)₃, THF, RT, 20 h, 56 %; e) LiAl(O^{*t*}Bu)₃H, EtOH, -78 °C, 7.5 h, 97 %.

Verbindung **61** wurde zunächst ausgehend von *N*-Boc-L-Serin (**55**) und Thiophenol über zwei verschiedene Carbodiimid-vermittelte Dehydratationswege erhalten. Durch das Kupplungsreagenz *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), welches in der Arbeit von Yang und Liebeskind Einsatz fand, wurde eine Ausbeute von 65 % erzielt.^[240] Die EDC-Variante lieferte zwar eine geringere Ausbeute von 44 %, jedoch erleichterte das freiwerdende wasserlösliche Harnstoffderivat die Aufarbeitung deutlich.

Nach anschließender Schützung der primären Hydroxygruppe mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid wurde Verbindung **34** mit einer guten Ausbeute von 87 % erhalten (Schema 13). Erst die Kombination aus DMF als Lösungsmittel, *N,N*-Dimethylpyridin-4-amin (DMAP) als Katalysator und *N*-Methylmorpholin (NMM) als Base ermöglichen bei diesem Reaktionsschritt eine hohe Silylierungsrate ohne Racemisierung des Produkts **34**.^[240]

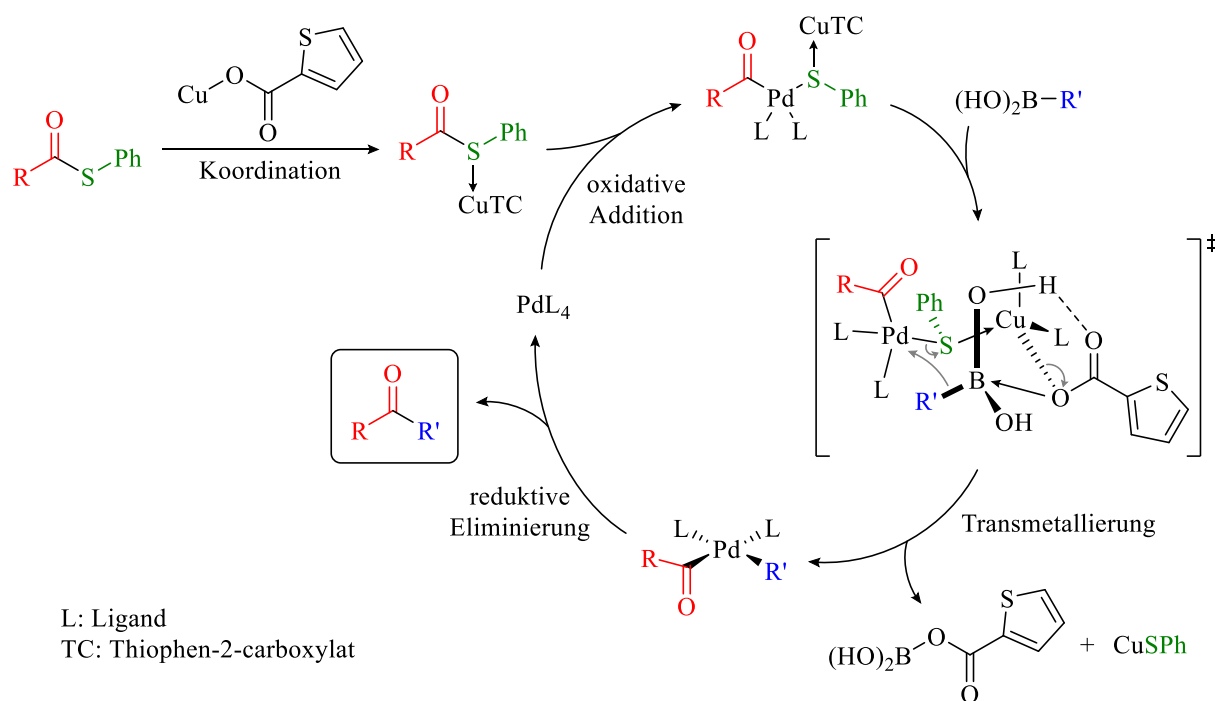
Die für die Liebeskind-Srogl-Kupplung benötigte Alkenyl-Boronsäure **63** wurde durch regioselektive Hydroborierung von 1-Pentadecin (**62**) mit Dibromborandimethylsulfid und anschließender Hydrolyse der B-Br-Bindungen erhalten. Vorteil des eingesetzten Borankomplexes ist die exzellente Regioselektivität der *syn*-Addition durch sterische und elektronische Kontrolle unter Ausbildung des *E*-konfigurierten Produkts nach *anti*-Markovnikov. Zudem wird eine weitere ungewünschte Hydroborierung an der gebildeten C-C-Doppelbindung, aufgrund von sterischer Abschirmung durch Koordination der Lewis-Base Dimethylsulfid an das Boratom, verhindert.^[347] Die nachfolgende Kreuzkupplung zwischen Thiophenylester **34** und Boronsäure **63** lieferte unter Erhalt der Konfiguration das α,β -ungesättigte Keton **35** (Schema 13).

Im aufgenommenen ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) von **35** ist das Dublett-Signal bei 6.26 ppm dem Proton *H*-4 zuzuordnen, während das Signal von *H*-5 aufgrund der zusätzlichen vicinalen Kopplung mit den benachbarten Methylenprotonen als Dublett von Triplets bei 6.96 ppm erscheint. Die ³*J*-Kopplungskonstante der beiden olefinischen Protonen von 15.7 Hz weist auf deren *trans*-Anordnung hin.

Zur Einführung des zweiten stereogenen Zentrums innerhalb des C₁₈-Gerüsts wurde, analog zur Synthese des Alkohols **38**, eine ethanolische Lösung des Ketons **35** bei -78 °C mit dem sterisch anspruchsvollen und selektiven Reduktionsmittel Lithiumtri-*tert*-butoxyaluminiumhydrid versetzt. Das geschützte Sphingosinderivat **36** wurde schließlich mit einer sehr guten Ausbeute von 97 % isoliert (Schema 13).

Somit wurde insgesamt, neben der Olefin-Kreuzmetathese von Allylalkohol **38** mit einem Grubbs-Katalysator, die Liebeskind-Srogl-Kupplung von Thiophenylester **34** als eine weitere bekannte Möglichkeit zum Aufbau des C₁₈-Sphingolipidgrundgerüsts erfolgreich genutzt.

Der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus der Palladium-katalysierten Kreuzkupplung zur Darstellung eines Ketons ist in Schema 14 dargestellt.



Schema 14: Reaktionsmechanismus der Liebeskind-Srogl-Kupplung zwischen einem Thiophenylester und einer Boronsäure unter der Bildung eines Ketons.^[348-350]

Bei der 2000 von Liebeskind und Srogl entwickelten C-C-Kupplungsreaktion ist der Einsatz einer Cu(I)-Carboxylatspezies in stöchiometrischen Mengen entscheidend.^[348] Das eingesetzte Kupfer(I)-thiophen-2-carboxylat (CuTC) dient als thiophiler Metall-Cofaktor, der zwei Funktionen einnimmt. Nach der oxidativen Addition des Thioesters an den Pd(0)-Katalysator wird zum einen durch Koordination des Cu(I)-Atoms an das Schwefelzentrum die Pd-S-Bindung polarisiert, zum anderen wird die trivalente Boronsäure durch Koordination des Carboxylats an das Boratom aktiviert.^[349] Nach der Transmetallierung vom Bor- zum Palladiumzentrum wird das freigesetzte Thiolat vom Cu(I)-Additiv abgefangen, was die benötigte stöchiometrische Menge an CuTC erklärt. Das gewünschte Keton sowie der katalytisch aktive Pd(0)-Komplex werden schließlich nach der reduktiven Eliminierung gebildet, wobei die Stereoinformationen der Edukte erhalten bleiben (Schema 14).^[349,350]

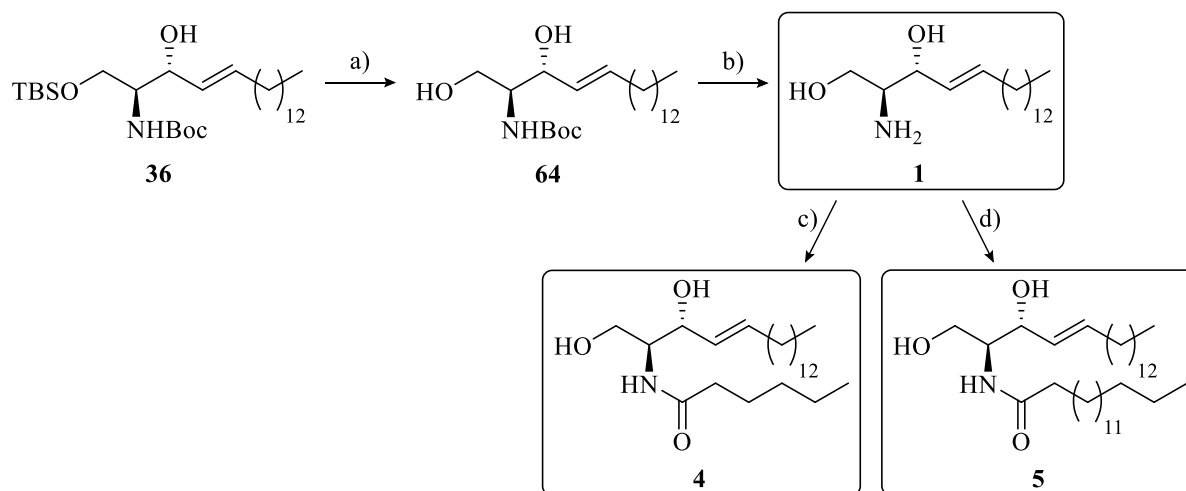
Der größte Vorteil der Cu(I)-vermittelten, Pd-katalysierten Thioester-Boronsäure-Kupplung ist die Durchführbarkeit unter neutralen Reaktionsbedingungen. Somit werden auch basenlabile Ausgangsverbindungen toleriert, was bei vielen anderen C-C-Knüpfungsreaktionen wie der Suzuki- oder Heck-Kupplung nicht möglich ist. Die erforderliche stöchiometrische Menge des Kupfercarboxylats sowie die Durchführung unter inerten Bedingungen, um die Oxidation der Cu(I)-Spezies zu verhindern, stellen jedoch Nachteile dar.^[350] Seit den Arbeiten von Liebeskind und Srogl im Jahr 2000 wurde die Methode bezüglich der Katalysatoren, Kupferspezies, Reaktanden oder Liganden stetig abgewandelt und für ein breiteres Anwendungsspektrum optimiert.^[349,350] Sieben Jahre später wurde erstmals eine Variante mit katalytischen Mengen an Kupfersalzen unter neutralen und aeroben Bedingungen beschrieben.^[351]

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewählte Kupplungsmethode zur erfolgreichen Darstellung des geschützten Sphingosinderivats **36** richtete sich nach der bekannten Arbeit von Yang und Liebeskind. Es wurde bereits gezeigt, dass die Synthesen glykosylierter oder Phosphorester-modifizierter Sphingolipide unter entsprechenden Reaktionsbedingungen ebenfalls möglich sind.^[240] Beide durchgeführten Synthesemethoden, sowohl die Olefinkreuzmetathese als auch die Liebeskind-Srogl-Kupplung, eignen sich somit für den Grundgerüstaufbau natürlicher und funktionalisierter Sphingolipide.

4.1.2 Natürliche Sphingolipide

Nachdem das native C₁₈-Rückgrat mit *E*-konfigurierter C-C-Doppelbindung und den beiden Stereozentren aufgebaut wurde, sollte zunächst die Synthese von Sphingosin (**1**) finalisiert werden. Die Sphingoidbase dient als wichtige Ausgangsverbindung für die chemische Synthese von Ceramiden, welche u. a. in der Herstellung von Liposomen Einsatz finden. Letztere können als einfache Modellsysteme die Untersuchung biophysikalischer Eigenschaften der Zellmembranen ermöglichen und zur Aufklärung des liposomalen Transports von Ceramiden innerhalb der Zelle beitragen.^[352,353]

Die Entfernung der beiden Schutzgruppen von **36** zur Darstellung der wichtigen Sphingosin-Schlüsselverbindung erfolgte in Anlehnung an Matsumori *et al.*, Yang und Liebeskind sowie an vorangegangene Arbeiten aus unserer Gruppe.^[282,283,327,348] Danach wurden durch Amidkupplung zwei natürliche Ceramide mit C₆- und C₁₆-Seitenketten synthetisiert (Schema 15).



Schema 15: Durchgeführte Synthesen der natürlichen Sphingolipide Sphingosin (**1**), C₆-Ceramid (**4**) und C₁₆-Ceramid (**5**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) TBAF, THF, 0 °C→RT, 20 min, 98 %; b) TFA, DCM, RT, 1 h, 49 %; c) Hexansäure, HBTU, DIPEA, DMF, 0 °C→RT, 2.5 h, quant.; d) Hexadecansäure, HBTU, DIPEA, DMF, 0 °C→RT, 2.5 h, 99 %.

Die selektive Abspaltung der Silylschutzgruppe von **36** wurde mit einer hohen Effizienz durch die Umsetzung mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) in trockenem Tetrahydrofuran erreicht. Um mögliche Eliminierungs- oder Substitutionsreaktionen des Allylalkohols durch dessen Protonierung bei sauren Bedingungen zu verhindern, wurde auf eine säurevermittelte Abspaltung der TBS-Gruppe verzichtet. Die unter milden Reaktionsbedingungen ablaufende selektive und effiziente Silyletherspaltung mit TBAF beruht auf der hohen Affinität des Fluoridanions zum Siliciumatom. Triebkraft der Reaktion ist die Ausbildung der thermodynamisch sehr stabilen Si-F-Bindung.^[354] Die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle zeigte nach wenigen Minuten die vollständige Umsetzung des Edukts an. Nach wässriger Aufarbeitung, Extraktion mit Essigsäureethylester und säulenchromatographischer Reinigung wurde *N*-Boc-Sphingosin (**64**) mit einer sehr guten Ausbeute von 98 % isoliert (Schema 15).

Die nachfolgende Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonylgruppe wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan im Volumenverhältnis 1:2 durchgeführt. Für die Isolierung des freienamins **1** ausgehend von dem entstandenen TFA-Ammoniumsalz wurde das Gemisch mit Natronlauge versetzt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel wurde das gewünschte Sphingosin (**1**) mit einer Ausbeute von 49 % erhalten (Schema 15). Für eine erhöhte Elutionskraft sowie bessere Trennleistung wurde Triethylamin als Additiv zur mobilen Phase gegeben, was jedoch in Kombination mit dem eingesetzten Kieselgel zur Bildung von Triethylammoniumsalzen führte. Diese wurden nach Entfernen des Lösungsmittels und Extraktion mit Dichlormethan erfolgreich aus den Produktfraktionen

abgetrennt, wobei die entsprechenden Salze in der wässrigen Phase verblieben. Ausbeuteverluste lassen sich durch die Bildung von Nebenprodukten während der Reaktion erklären, die im Rahmen dieser Arbeit nicht isoliert oder charakterisiert wurden. Möglicherweise kommt es aufgrund der hohen Säurekonzentration und der Durchführung bei Raumtemperatur zur Abspaltung der sekundären allylischen Hydroxygruppe, wobei ein resonanzstabilisiertes Carbokation entsteht. Daraufhin sind verschiedene Reaktionsabläufe denkbar: Deprotonierung an C-2 unter Ausbildung einer C-C-Doppelbindung, intermolekularer nukleophiler Angriff einer Hydroxyfunktion oder intramolekularer Ringschluss mit der benachbarten Boc-Gruppe.

Das aus der Aminosäure L-Serin (**24**) totalsynthetisch hergestellte Sphingosin (**1**) diente fortan als wichtige Ausgangsverbindung zum Aufbau von Ceramiden. Durch die Amidkupplung mit Hexansäure wurde das kurzketzige C₆-Ceramid (**4**) erhalten, während für die Synthese des langkettigen C₁₆-Ceramids (**5**) Hexadecansäure eingesetzt wurde. Für beide Reaktionen diente das Aminiumsalz HBTU als Kupplungsreagenz, welches sich durch eine hohe Aktivität mit geringer Neigung zur Racemisierung auszeichnet.^[355,356] Mit freien Aminogruppen kann es zu einem Guanidin-Nebenprodukt reagieren, wodurch die gewünschte Kupplung zum Erliegen kommt.^[357,358] Die Reihenfolge der Zugabe von Edukten und Reagenzien war deshalb für den Erfolg der Kupplungen zu **4** und **5** entscheidend. Die Carbonsäuren wurden jeweils zuvor in DMF unter basischen Bedingungen mit dem Kupplungsreagenz für 20 Minuten aktiviert und erst danach wurde ein Äquivalent Sphingosin (**1**) zugegeben. Die Zugabe erfolgte in einer Portion, sodass es wegen der stärkeren Nukleophilie der Aminofunktion im Vergleich zu den Hydroxygruppen bevorzugt zur Ausbildung einer Amidbindung kommt und keine Veresterung stattfindet. Beide natürlichen Ceramide wurden nach säulenchromatographischer Reinigung mit ausgezeichneten bzw. quantitativen Ausbeuten isoliert (Schema 15).

Die erhaltenen ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopischen Daten der Ceramide **4** und **5** stimmen gut mit denen aus der Literatur überein.^[241,359] Die jeweilige Aufnahme eines HMBC-Spektrums bestätigte die erfolgreiche *N*-Acylierung. Aufgrund der ²*J*-Kopplung des Amidprotons mit dem Carbonyl-C-Atom ist ein Kreuzsignal zu beobachten. Weiterhin weist das Carbonylkohlenstoffatom im HMBC-Spektrum eine Kopplung über drei Bindungen zu *H*-2 auf.

In Kooperation mit Sascha Eder (AG Dr. Niklas Beyersdorf, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) fanden die Ceramide **4** und **5** Anwendung bei der Herstellung von Liposomen. Diese sollen in Kombination mit bioorthogonal funktionalisierten Ceramidanaloga in weiterführenden Experimenten zur Aufklärung der biochemischen Grundlage für den unterschiedlichen Einbau von Ceramid in verschiedene T-Zellsubpopulationen beitragen.

4.1.3 Bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipidderivate

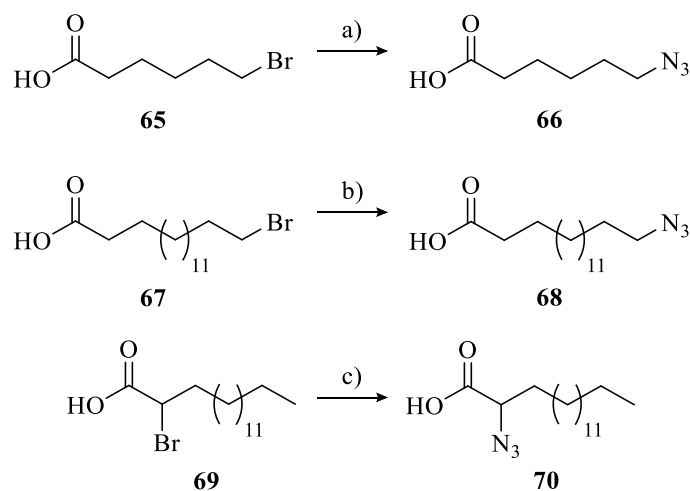
Für die Untersuchung der zellulären Lokalisation und Dynamik von Sphingolipiden unter physiologischen Bedingungen finden immer häufiger bioorthogonal funktionalisierte Lipid-derivate Anwendung.^[18,19,360] Die synthetisch eingeführten Click-Funktionen, wie eine Alkin- oder Azidgruppe, sind metabolisch stabil, besitzen im Gegensatz zu fluorophoren Markierungen einen geringen sterischen Anspruch und verändern kaum die Polarität des Sphingolipids. Durch die Imitation des natürlichen Verhaltens wird eine mögliche Fehllokalisation des zu untersuchenden Lipids verhindert. Die intrazelluläre Markierung erfolgt *in situ* durch eine schnelle und selektive Click-Reaktion mit einem komplementär modifizierten Fluorophor. Da sich die Sphingolipidanaloga aufgrund der eingeführten Click-Gruppe im Vergleich zu ihren nativen Gegenstücken bezüglich des Molekulargewichts unterscheiden, können sie auch in massenspektrometrischen Metabolismusstudien eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten für verschiedene Projekte der Forschergruppe 2123 und des Graduiertenkollegs 2581 sowohl bekannte funktionalisierte Sphingolipidanaloga als auch neuartige, maßgeschneiderte molekulare Werkzeuge synthetisiert werden. Diese sollen zur Aufklärung des komplexen Sphingolipidmetabolismus und den damit verbundenen biologischen Prozessen dienen, sodass neue Therapieansätze zur Behandlung sphingolipidbasierter Krankheiten entwickelt werden können.

4.1.3.1 Ceramide mit azidfunktionalisierten Seitenketten

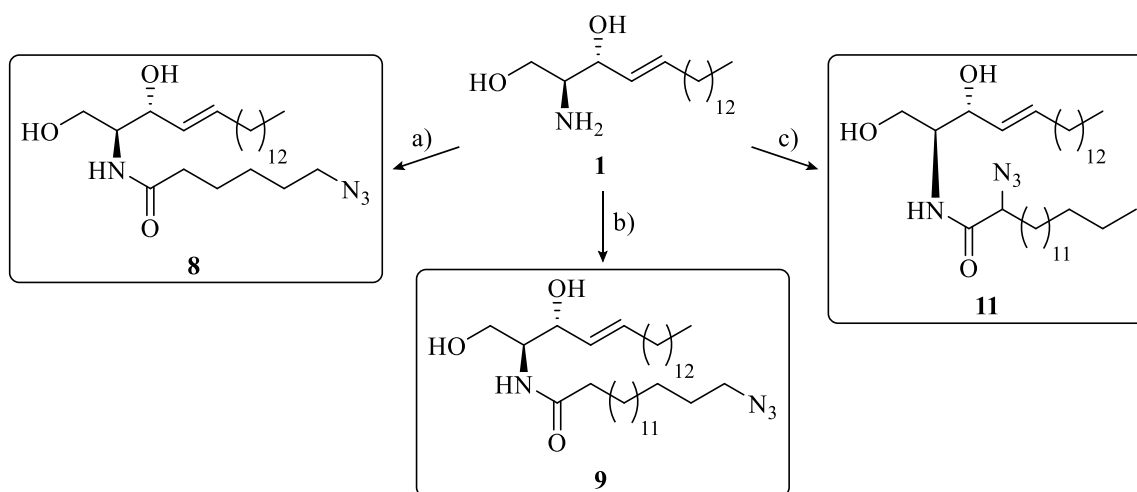
Azidmodifizierte Ceramidderivate, bei denen sich die Click-Funktionen an unterschiedlichen Positionen innerhalb des *N*-acylierten Fettsäurerestes befinden, wurden erstmals in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert. Zusätzlich wurden die Seitenkettenlängen der Derivate variiert.^[190] Die N_3 -Ceramide wurden bereits als hilfreiche Werkzeuge zur Aufklärung unterschiedlicher biologischer Prozesse eingesetzt, wobei deren größter Vorteil die kupferfreie Konjugation mit gespannten Alkinen zur Markierung in lebenden Zellen darstellt.^[189,190,274,281,361,362]

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Synthese von ω - N_3 - C_6 -Ceramid (**8**), ω - N_3 - C_{16} -Ceramid (**9**) und α - N_3 - C_{16} -Ceramid (**11**) ausgehend von Sphingosin (**1**) reproduziert werden. Die dafür benötigten azidfunktionalisierten Carbonsäuren wurden nach Walter *et al.* ausgehend von den bromierten Vorstufen durch S_N2 -Reaktionen mit Natriumazid in *N,N*-Dimethylformamid als polar-aprotisches Lösungsmittel dargestellt (Schema 16).^[281]



Schema 16: Durchgeführte Synthesen azidfunktionalisierter Carbonsäuren ausgehend von den entsprechenden bromierten Säuren. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) NaN_3 , DMF, 70°C , 24 h, 85 %; b) NaN_3 , DMF, 70°C , 24 h, 92 %; c) NaN_3 , DMF, 50°C , 24 h, 85 %.

Die Carbonsäuren wurden nach säulenchromatographischer Reinigung mit Ausbeuten von 85 % und 92 % erhalten. Anschließende Amidkupplungsreaktionen mit Sphingosin (**1**) unter basischen Bedingungen führten zu den gewünschten azidmodifizierten Ceramidderivaten **8**, **9** und **11** (Schema 17).



Schema 17: Durchgeführte Synthesen von Ceramidderivaten mit azidfunktionalisierten Seitenketten durch Amidkupplung von Sphingosin (**1**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) *Variante 1:* **66**, EDC·HCl, HOBt·H₂O, DIPEA, DCM, 0°C , 2 h, dann RT, 2 d, 56 %, *Variante 2:* **66**, HATU, DIPEA, DCM, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 19 h, 66 %, *Variante 3:* **66**, HBTU, DIPEA, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 2 h, 77 %; b) *Variante 1:* **68**, EDC·HCl, HOBt·H₂O, DIPEA, DCM, 0°C , 1.5 h, dann RT, 20 h, 95 %, *Variante 2:* **68**, HBTU, DIPEA, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 2 h, 99 %; c) *Variante 1:* **70**, EDC·HCl, HOBt·H₂O, DIPEA, DCM, 0°C , 1.5 h, dann RT, 20 h, 66 %, *Variante 2:* **70**, HBTU, DIPEA, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 1.5 h, 89 %.

Zunächst wurde die bekannte Synthesemethode der EDC/HOBt-vermittelten Amidkupplung durchgeführt. Hierfür wurde Sphingosin (**1**) jeweils mit den Kupplungsreagenzien vorgelegt und die Säure bei 0 °C langsam zugetropft, um die selektive Reaktion der nukleophileren Aminofunktion zu gewährleisten. Für ω -N₃-C₁₆-Cer (**9**) wurde eine sehr gute Ausbeute von 95 % erreicht, während ω -N₃-C₆-Cer (**8**) mit 56 % und α -N₃-C₁₆-Cer (**11**) mit 66 % Ausbeute isoliert wurden. Durch den Einsatz von HBTU als aktives Kupplungsreagenz konnten die Ausbeuten schließlich auf 77 % für **8**, 99 % für **9** und 89 % für **11** gesteigert werden.

Das synthetisierte kurzkettige ω -N₃-C₆-Ceramid (**8**) wurde daraufhin von Teresa Wiese aus der Arbeitsgruppe von Dr. Niklas Beyersdorf (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) zur Untersuchung von T-Zellvorgängen eingesetzt.

Der komplexe Sphingolipid-Metabolismus beeinflusst durch Bildung, Modifikation und Abbau einer Vielzahl an strukturgebenden und bioaktiven bzw. signalgebenden Lipidspezies alle Zellen des Körpers, so auch die der Immunabwehr dienenden T-Zellen. Die saure Sphingomyelinase (ASM) besitzt hierbei eine entscheidende Rolle, da sie die enzymatische Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid, der zentralen Verbindung der Sphingolipid-Biosynthese, katalysiert. In Mäusen führt eine ASM-Defizienz bzw. -Hemmung, sei es genetisch oder durch einen Inhibitor pharmazeutisch hervorgerufen, zu einer erhöhten Aktivität von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) in CD4⁺-T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp.^[363,364] Dies wurde z. B. durch die Injektion von Amitriptylin gezeigt, wobei die ASM abgebaut und die Aktivität der T_{Reg} erhöht wurde.^[363] Durch den gezielten Einsatz eines ASM-Inhibitors ist es also möglich, das Gleichgewicht zwischen regulatorischen und konventionellen T-Zellen (T_{Konv}) auf die Seite der T_{Reg} zu verschieben. In einem Masernvirus-Infektionsmodell des zentralen Nervensystems führte diese Gleichgewichtsverschiebung zu einer verminderten Widerstandsfähigkeit gegenüber der viralen Infektion.^[363] Diese Tatsache stellt wiederum ein mögliches Ziel für die Behandlung von Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose mit Hilfe von ASM-hemmenden Wirkstoffen dar. Zudem kann die gezielt eingeleitete Minderung der körpereigenen Immunantwort möglicherweise bei einer Influenza A-Virusinfektion genutzt werden, bei der eine überschießende Immunantwort häufig die Gesundheit und das Überleben der Patienten stark beeinträchtigt.^[365]

Um solche Therapieansätze entwickeln zu können, wurde von Teresa Wiese (AG Dr. Niklas Beyersdorf, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) der Zusammenhang zwischen ASM-Aktivität und T-Zellvorgängen in humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) untersucht.

In CD4⁺ T-Zellen wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine erhöhte T_{Reg}-Aktivität nach der gezielten, pharmakologischen Inhibition der ASM durch bekannte Antidepressiva wie Sertralin beobachtet. Als mechanistischer Hintergrund für die erhöhte T_{Reg}-Aktivität in CD4⁺ T-Zellen wurde die CD28-(Co-)Stimulation nachgewiesen, sodass diese einen Teil der Wirkungsweise von klinisch gewöhnlich eingesetzten, ASM-hemmenden Antidepressiva darstellt. Zudem weisen CD4⁺ regulatorische T-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen zum einen eine erhöhte Aktivität der ASM auf und zum anderen verfügen sie über mehr Ceramid, was mit einer veränderten Lipidordnung der Zellmembran zusammenhängt.

In vorangegangenen Arbeiten wurde in Mäusen eine erhöhte ASM-Aktivität in T_{Reg} gegenüber T_{Konv} mit einer geringeren Anzahl an Zellen mit hoher Lipidordnung bei T_{Reg} in Verbindung gebracht.^[363] Das im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierte ω -N₃-C₆-Ceramid (**8**) wurde in der Studie von Wiese *et al.* für die Untersuchung der Lipidmembranordnung eingesetzt. Die dabei durchgeführte Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) (Abbildung 9) zur Quantifizierung des in PBMC eingebauten C₆-Ceramids wurde mittels Click-Reaktion zwischen dem Azid und einem Alkin-funktionalisierten Farbstoff (DIBO-488) durchgeführt.^[366]

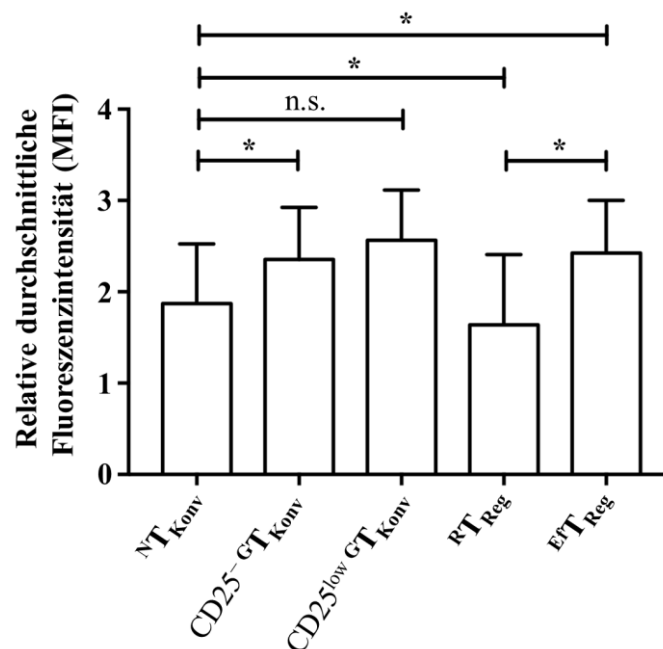


Abbildung 9: FACS-Analyse der Aufnahme von ω -N₃-C₆-Ceramid (**8**) in die CD4⁺ T-Zellsubtypen von PBMC. Die Click-Reaktion erfolgte mit einer Konzentration von 25 μ M des Azids nach den Protokollen von Collenburg *et al.* und Hollmann mit n = 8 (unabhängige Experimente) und * p < 0.05.^[274,367] Die Experimente und Datenauswertung wurden von Teresa Wiese (AG Dr. Niklas Beyersdorf, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Brain Communications* entnommen und modifiziert.^[366]

Unabhängig von der Zelllinie wurde festgestellt, dass eine geringere Anzahl an Zellen, die eine hohe Lipidordnung der Zellmembran besitzen, mit einer Effektor/Gedächtnis-Differenzierung korrelieren. Sowohl regulatorische Effektor- ($^{Ef}T_{Reg}$) als auch konventionelle Gedächtnis-T-Zellen ($^{G}T_{Konv}$) zeigten eine stärkere Aufnahme des clickbaren C₆-Ceramide **8** im Vergleich zu ruhenden T_{Reg} ($^{R}T_{Reg}$) und naiven T_{Konv} ($^{N}T_{Konv}$), was eine erhöhte Anzahl an Zellen mit niedriger Lipidordnung widerspiegelt (Abbildung 9).^[366]

Die bislang unbekannt biochemische Grundlage bzw. der Zusammenhang zwischen der bereits in den T-Zellmembranen vorhandenen Ceramid-Konzentration und der Fähigkeit zur weiteren Aufnahme von extern zugegebenen Ceramiden wurde in einem Projekt von Sascha Eder (AG Dr. Niklas Beyersdorf, Julius-Maximilians-Universität) mit Hilfe der synthetisierten ω -azidofunktionalisierten Ceramide **8** und **9** adressiert. Hierfür wurden mittels Filmmethode und Extrusion hergestellte Liposome als Modellmembranen verwendet. Die Liposomen bestanden aus dem Phospholipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) mit verschiedenem Cholesterol- und Ceramidgehalt. Der Einbau von Ceramid wurde massenspektrometrisch überprüft und quantifiziert. Anschließend wurde untersucht, ob der Ceramidgehalt der Liposomen einen Einfluss auf den Einbau extern zugegebener, clickbarer Ceramide (ω -N₃-C₆-Cer (**8**), ω -N₃-C₁₆-Cer (**9**)) in die Liposomenmembran hat. Die Untersuchung erfolgte durch HPLC-MS/MS und fluoreszenzspektroskopisch nach der Click-Reaktion mit DIBO-Alexa Fluor 488. Es wurde gezeigt, dass ceramidhaltige Vesikel mehr Azidoceramide aufnehmen als ceramidfreie bzw. dass ein höherer Anfangsgehalt an Ceramid zu einer höheren Kapazität nach dem Einbau führt. Dies stützt die Annahme, dass der verstärkte Einbau von clickbarem Ceramid in T_{Reg} tatsächlich einen höheren Ceramidgehalt in der Plasmamembran von T_{Reg} im Vergleich zu T_{Konv} widerspiegelt.

In einem weiteren Projekt der Gruppe von Dr. Niklas Beyersdorf wird die Bindung des von dem Hefepilz *Candida albicans* sezernierten pH-regulierten Proteins (Pra1) mit humanen T-Zellen untersucht. Opportunistische Infektionen durch *Candida albicans* sind die Hauptursache für die Morbidität von immungeschwächten Patienten.^[368] Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den vom Pilz abgesonderten Proteinen und den Immunzellen ist daher für die Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung oder zum Schutz gegen eine invasive Pilzinfektion von Interesse. In vorangegangenen Studien wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass rekombinantes Pra1 an CD4⁺ T-Zellen von Mäusen und humane T-Zellen (unveröffentlichte Daten) bindet und somit deren Effektorfunktionen beeinflusst.^[368] Noch ist unklar, welche Wechselwirkungen für diese Bindung verantwortlich sind, sodass auch hier ein möglicher Einfluss des Ceramidgehaltes in einem Liposomen-Membranmodell mit der im Rahmen dieser Doktorarbeit

synthetisierten, natürlichen (**4**, **5**) und ω -N₃-funktionalisierten C₆- und C₁₆-Ceramide (**8**, **9**) untersucht wird. Es soll geklärt werden, ob Ceramide womöglich Interaktionspartner von Pral sind und somit Angriffspunkte für eine neuartige Therapie bei Pilzinfektionen darstellen.

Des Weiteren fand das synthetisierte, langkettige ω -N₃-C₁₆-Ceramid (**9**) in einem Projekt von Dr. Shaghayegh Derakhshani (AG Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) für die Untersuchung der Ceramidlokalisation in dendritischen Zellen nach einer Masernvirusinfektion Einsatz. Die hochansteckende Infektionskrankheit Masern ist, begleitet von Mangelernährung und einem erschwerten Zugang zum entsprechenden Impfstoff, vor allem in Entwicklungsländern eine der Hauptursachen für Kindersterblichkeit.^[369,370] Die hohe Mortalitätsrate beruht größtenteils auf der virusinduzierten und langandauernden Immunsuppression, welche sekundäre Infektionen durch andere Pathogene begünstigt.^[370,371] Häufige bakteriell oder viral ausgelöste Folgeerkrankungen, die oft einen tödlichen Ausgang nehmen, sind Pneumonie, Diarrhoe und Enzephalitis.^[372] Dendritische Zellen sind als Antigen-präsentierende Zellen für die Initiation und Qualität der Immunreaktion nach Pathogenkontakt von zentraler Bedeutung.^[370,373] Der Zusammenhang zwischen Virus-Immunzell-Interaktion und Aktivierung bzw. Suppression des Immunsystems muss daher für ein genaueres Verständnis viraler Infektionen und für die Entwicklung antiviraler Therapeutika näher untersucht werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass der Masernviruskontakt von dendritischen Zellen die zelluläre Aktivierung von Sphingomyelinasen zur Folge hat.^[374,375] Der stimulierte Sphingomyelinabbau führt dabei zu einer vermehrten Bildung von Ceramid und zum Aufbau Ceramid-angereicherter Mikrodomänen. Durch ihre biophysikalischen Eigenschaften ermöglichen diese Membranplattformen im Allgemeinen die Rekrutierung membranproximaler Rezeptoren oder Signalkomponenten und führten bei den durchgeführten Studien in dendritischen Zellen zum Eintritt des Masernvirus und zur T-Zellparalyse.^[374-377] Um die physiologischen Effekte von Lipiddynamiken auf die Immunreaktion zu verstehen, ist eine Analyse des räumlichen und zeitlichen Einbaus von bioaktiven Sphingolipiden von zentraler Bedeutung. Das ω -N₃-C₁₆-Ceramid (**9**) ermöglichte in den von Dr. Shaghayegh Derakhshani durchgeführten Experimenten erstmals die Visualisierung Ceramid-angereicherter Membrandomänen und deren Dynamik in *in vitro* generierten dendritischen Zellen vor und nach einer Masernvirusinfektion. Hierfür wurden scheininfizierte (Kontrolle) und infizierte Zellen mit Azid **9** gefüttert und das Ceramid nach Inkorporation mit einem DBCO-funktionalisierten Cyaninfarbstoff markiert. Anschließend erfolgte die Analyse des Ceramideinbaus mit einem Konfokalmikroskop (Abbildung 10).

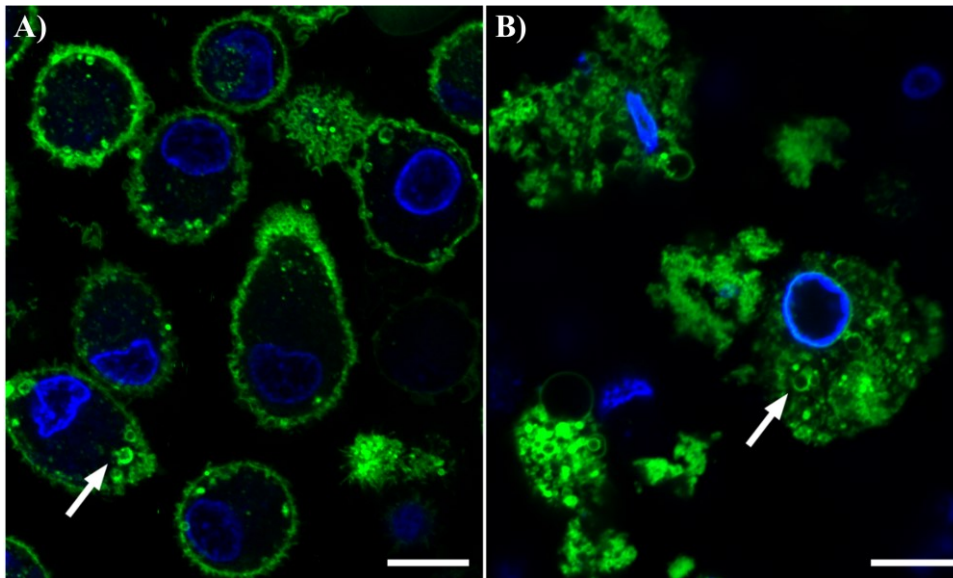


Abbildung 10: Konfokalmikroskopieaufnahmen von Mock-behandelten/scheininfizierten (A) und Masernvirus-infizierten dendritischen Zellen (B), welche mit ω -N₃-C₁₆-Ceramid (**9**) inkubiert und nach 30 min mit DBCO-Sulfo-Cy5 durch Click-Reaktion visualisiert (grün) wurden. Die Analyse erfolgte bei einer Laserwellenlänge von 488 nm. Intrazelluläre Strukturen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 10 μ m. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Shaghayegh Derakhshani (AG Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies, JMU Würzburg) durchgeführt. Unveröffentlichte Ergebnisse.

Das Ceramid **9** ist in unreifen dendritischen Zellen vorwiegend Plasmamembran-assoziiert lokalisiert und es sind nur wenige intrazelluläre Vesikel zu erkennen, welche sich hauptsächlich in der Nähe der Plasmamembran befinden (Abbildung 10 A). Masernvirus-infizierte Zellen zeigen eine erhöhte Ceramidaufnahme und -akkumulation, da verstärkt intrazelluläre Vesikel ohne Assoziation mit der Plasmamembran zu erkennen sind (Abbildung 10 B). Es kommt zu einer reifungsbedingten, virusinduzierten Steigerung der endozytischen Aktivität der Zellen. Eine zusätzliche Durchflusszytometrieanalyse bestätigte die erhöhte exogene Inkorporation von ω -N₃-C₁₆-Ceramid (**9**) in die dendritischen Zellen nach Pathogenkontakt.

Die strenge Regulierung der Gesamtmenge und der lokalen Anreicherung von Ceramiden durch Kontrolle der Sphingomyelinaseaktivität nach einer Masernvirusinfektion beeinflusst T-Zellen, dendritische Zellen und somit das gesamte Immunsystem. Die synthetisierten Azidoceramide **8**, **9** und **11** stellen hilfreiche Werkzeuge für die Aufklärung von Virusinfektionen auf zellulärer Ebene, genauer auf Basis des Sphingolipidmetabolismus, dar. Die Vorarbeiten mit ω -N₃-C₁₆-Ceramid (**9**) sowie weiterführende Untersuchungen sollen die Entwicklung von Therapeutika oder immunomodulatorischer Applikationen gegen diverse virale Infektionen ermöglichen, bei denen die gezielte Manipulation des Sphingolipidmetabolismus genutzt wird.

4.1.3.2 Bifunktionelles Amino(azido)ceramid

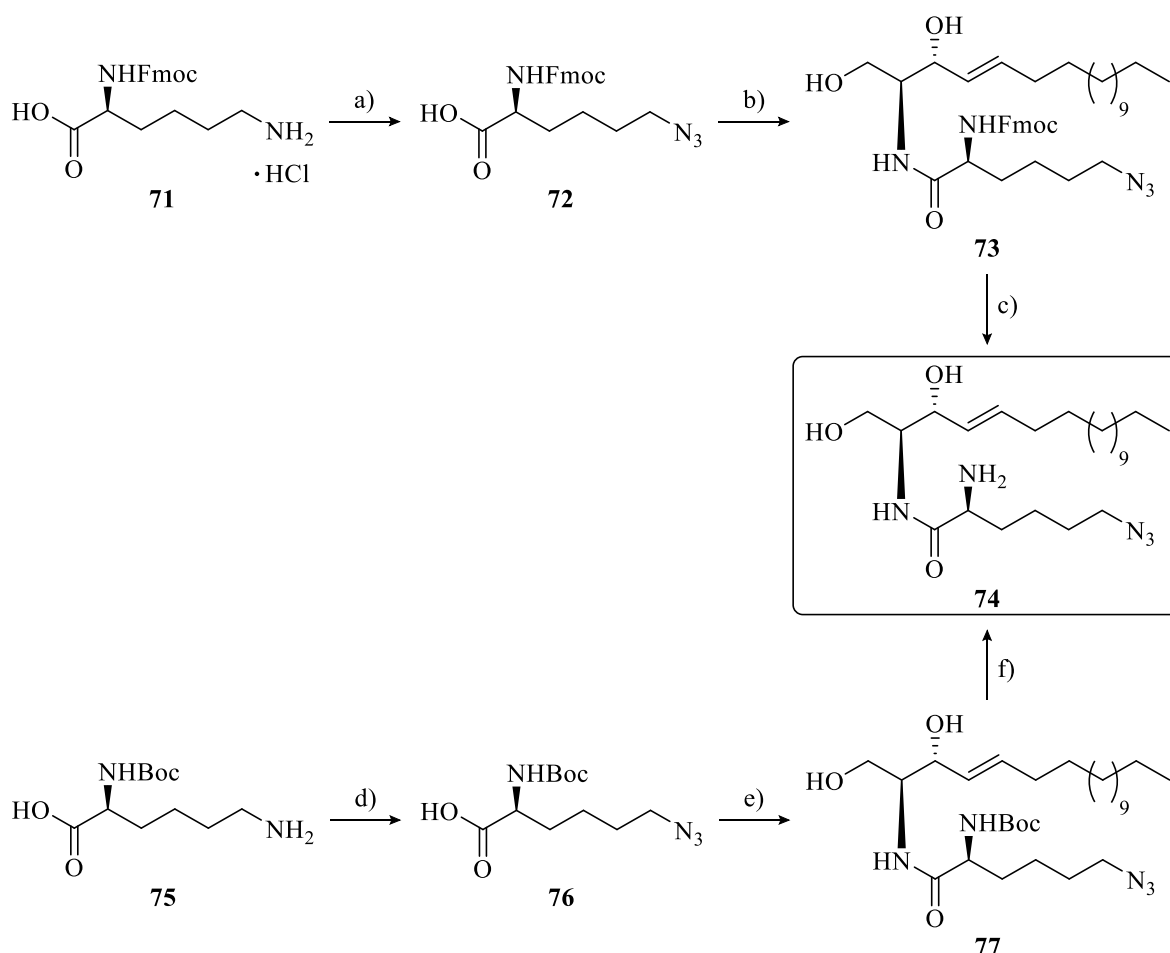
In den letzten zehn Jahren entwickelte sich die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie zu einer sehr leistungsfähigen Methode für die detaillierte Bildgebung von Zellen und für Strukturuntersuchungen von Zellorganellen mit Subdiffraktionsauflösung.^[378] Mit Hilfe von hochauflösenden Methoden, wie der direkten stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie (*d*STORM), ist nun eine räumliche Auflösung biologischer Strukturen möglich, welche weit unter der von Abbe berechneten Beugungsgrenze der klassischen Lichtmikroskopie von ca. 250 nm liegt.^[14,379-381] Dies ermöglicht wertvolle Einblicke in die räumliche zelluläre Organisation von verschiedenen Biomolekülen, darunter auch Ceramiden. Natürliche Sphingolipide können durch Immunzytochemie mit fluorophoren Antikörpern visualisiert werden, während bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipidanaloga Click-Reaktionen mit geeigneten photoschaltbaren Farbstoffen eingehen können.^[189,382] Insbesondere dreidimensionale und mehrfarbige hochauflösende Mikroskopieverfahren erfordern jedoch eine umfassende Ausrüstung sowie Erfahrung und sind daher meist auf spezialisierte Labore beschränkt.

Einen alternativen Ansatz zur Überwindung der von Abbe entdeckten maximalen Auflösungsgrenze bietet die Expansionsmikroskopie (ExM), welche eine hochauflösende Bildgebung mit Standardfluoreszenzmikroskopen ermöglicht. Für die gezielte Untersuchung eines Biomoleküls wird dieses mit einem dichten Netzwerk eines quellbaren Polyelektrolythydrogels verknüpft. Durch Zugabe von Wasser wird die biologische Probe daraufhin physikalisch expandiert, wodurch mit konfokaler Laserrastermikroskopie (Laser-Scanning-Mikroskopie) eine laterale Auflösung von etwa 70 nm ermöglicht wird. Seit ihrer Einführung durch Boyden *et al.* im Jahr 2015 brachte die ExM viele beeindruckende Ergebnisse hervor.^[383] So konnten markierte Proteine und Nukleinsäuren mit fluoreszierenden Proteinen, Antikörpern bzw. Oligonukleotiden in Zellen, Gewebe und humanen klinischen Proben stark vergrößert visualisiert werden.^[384] Die stetig weiterentwickelten ExM-Protokolle ermöglichen bereits Expansionsfaktoren von 4 bis 10 und durch iterative Expansion sogar von 20.^[383,385,386]

Um für die ExM verwendbar zu sein, müssen die Moleküle, welche von Interesse sind, Aminogruppen aufweisen. Die nukleophilen Aminofunktionen können z. B. mit Glutaraldehyd (GA) oder Methacrylsäure-*N*-hydroxysuccinimidester (MA-NHS) reagieren und dadurch in das Polyelektrolythydrogel eingebettet werden.^[387] Die Plasmamembran von pro- und eukaryotischen Zellen besteht hauptsächlich aus Glycerophospholipiden, *N*-acylierten Sphingolipiden und Cholesterol. Da diese Lipide keine primäre Aminogruppe besitzen, können sie weder durch

Form-/Glutaraldehyd oder andere gängige Fixiermittel verankert noch unter Verwendung verfügbarer ExM-Protokolle expandiert werden.^[388]

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte daher ein ExM-kompatibles C₆-Ceramid synthetisiert werden, welches zum einen eine Azidgruppe für die Konjugation mit einem Fluorophor über SPAAC und zum anderen eine primäre Aminogruppe für die Verankerung im Hydrogel besitzt. Damit die natürlichen Eigenschaften weitestgehend erhalten bleiben, sollte die Azidfunktion wie bei ω -N₃-C₆-Ceramid (**8**) (Kapitel 4.1.3.1) am hydrophoben Seitenkettenende und die zusätzliche NH₂-Gruppe nah am polaren Lipidkopf eingeführt werden. Das entsprechende bifunktionelle α -Amino- ω -azido-C₆-Ceramid (**74**) wurde über zwei Syntheserouten ausgehend von geschützten L-Lysinderivaten und Sphingosin (**1**) dargestellt (Schema 18).



Schema 18: Durchgeführte Synthese des Amino(azido)ceramids **74** ausgehend von ω -N₃-N-Fmoc-L-Lysin (**71**) bzw. ω -N₃-N-Boc-L-Lysin (**75**) durch Diazotransfer und anschließende Amidkupplung mit Sphingosin (**1**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Tf₂O, NaN₃, MeCN, 0 °C, 2,5 h, dann CuSO₄, NEt₃, MeCN/H₂O, 0 °C→RT, 16 h, 59 %; b) **1**, HBTU, DIPEA, DMF, 0 °C→RT, 2,5 h, 31 %; c) Piperidin, DMF, RT, 45 min, 46 %; d) Tf₂O, NaN₃, MeCN, 0 °C, 2,5 h, dann CuSO₄, NEt₃, MeCN, 0 °C→RT, 18 h, 85 %; e) **1**, HATU, NEt₃, DMF, 0 °C→RT, 4 h, 48 %; f) TFA, DCM, 0 °C, 2 h, 39 %.

Sowohl bei der Fmoc- als auch der Boc-Variante wurde zunächst die Azidgruppe in ω -Position der geschützten Aminosäure über einen Kupfer(II)-katalysierten Diazotransfer mit *in situ*-generiertem Triflylazid (TfN_3) eingeführt (Schema 18). Dazu wurde auf eine 2005 von Yan *et al.* publizierte Methode zurückgegriffen, bei der im Vergleich zu klassischen Diazotransferprotokollen geringere Mengen an toxischem Natriumazid und Triflylanhydrid ($\text{ Tf}_2\text{O}$) eingesetzt werden können.^[389] Im Allgemeinen zeichnen sich metallkatalysierte Diazotransferreaktionen für die Alkylazidsynthese ausgehend von primären Aminen mittels Triflylazid als Diazodonor durch hohe Ausbeuten, Retention der Konfiguration, milde Reaktionsbedingungen und Toleranz gegenüber vielen weiteren funktionellen Gruppen aus.^[389,390]

Im Gegensatz zu typischen Vorschriften, bei denen die *in situ*-Generierung von TfN_3 in einem Dichlormethan-Wasser-Gemisch stattfindet, wurden in Anlehnung an Yan *et al.* unter wasserfreien Bedingungen 1.44 Äquivalente Natriumazid in Acetonitril suspendiert und tropfenweise mit 1.20 Äquivalenten Triflylanhydrid versetzt. Die Abwesenheit von Wasser minimiert die Verluste durch mögliche Hydrolyse des eingesetzten Anhydrids.^[389] Nachdem das Gemisch 2.5 Stunden bei 0 °C gerührt wurde, wurde die entstandene TfN_3 -Lösung zu einer Mischung aus einem Äquivalent der geschützten Aminosäure **71** bzw. **75**, Triethylamin und 1 Mol-% Kupfer(II)-sulfatpentahydrat gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde jeweils über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit verdünnter Salzsäure versetzt und mit Ethylacetat extrahiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde ω - N_3 -*N*-Fmoc-L-Lysin (**72**) mit 59 % erhalten, während ω - N_3 -*N*-Boc-L-Lysin (**76**) mit einer Ausbeute von 85 % isoliert wurde.

Die nachfolgende Amidkupplung von **72** und Sphingosin (**1**) zu α -*N*-Fmoc- ω - N_3 - C_6 -Cer (**73**) wurde unter basischen Bedingungen mit HBTU durchgeführt und das geschützte Ceramidderivat wurde mit 31 % Ausbeute erhalten. α -*N*-Boc- ω - N_3 - C_6 -Cer (**77**) wurde ausgehend von **76** mit HATU als Kupplungsreagenz mit einer höheren Ausbeute von 48 % isoliert. Die finale Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20%iger Piperidinlösung in DMF durchgeführt, während die Boc-Gruppe säurekatalysiert mit TFA in Dichlormethan entfernt wurde. Die dünn-schichtchromatographischen Reaktionskontrollen zeigten bei beiden Varianten die Bildung mehrerer Nebenprodukte, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht isoliert oder charakterisiert wurden. Bei der Boc-Abspaltung sind bereits erwähnte Nebenreaktionen des Allylalkohols denkbar (Kapitel 4.1.2). Für eine erhöhte Elutionskraft sowie eine bessere Trennleistung wurde bei der säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel wässrige Ammoniaklösung als Additiv zur mobilen Phase gegeben. Das gewünschte bifunktionelle Amino(azido)ceramid **74** wurde mit vergleichbaren Ausbeuten von 46 % für die Fmoc-Variante und 39 % für die Boc-Variante als farbloser Feststoff isoliert (Schema 18).

Die erhaltenen massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Daten bestätigen die erfolgreiche Synthese von α -NH₂- ω -N₃-C₆-Ceramid (**74**). Zusätzlich zu den ¹H- und ¹³C-NMR-Signalen aus 1D-Messungen wurden ¹⁵N-Signale indirekt aus den Projektionen der (¹H,¹⁵N)-HSQC- und -HMBC-Spektren (CDCl₃, 600 MHz) erhalten. Das Stickstoffatom der primären Aminogruppe resoniert bei einer chemischen Verschiebung von -352.3 ppm, während das Amid-N-Atom dem Signal bei -265.8 ppm zuzuordnen ist. Für die Azidfunktion erscheint ein Peak bei -309.4 ppm für das C-gebundene und bei -132.8 ppm für das mittlere N-Atom. Das terminale Stickstoffatom war bei den gewählten Messparametern nicht detektierbar.

Die in der Gruppe von Prof. Dr. Markus Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) durchgeführten Experimente und aufgenommenen konfokalen Fluoreszenzbilder bestätigen den Einbau von ω -N₃-C₆-Cer (**8**) und α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) in die Plasmamembran von HeLa229-Zellen und in Membranen intrazellulärer Organellen (Abbildung 11). Das Ceramid-analogon **8** wurde nach Zugabe von Detergentien effizient aus der Plasmamembran der Zellen ausgewaschen, während das Fluoreszenzsignal des Amino(azido)ceramids **74** aufgrund der Fixierung im Glutaraldehydnetzwerk nur geringfügig abnahm und wochenlang erhalten blieb.

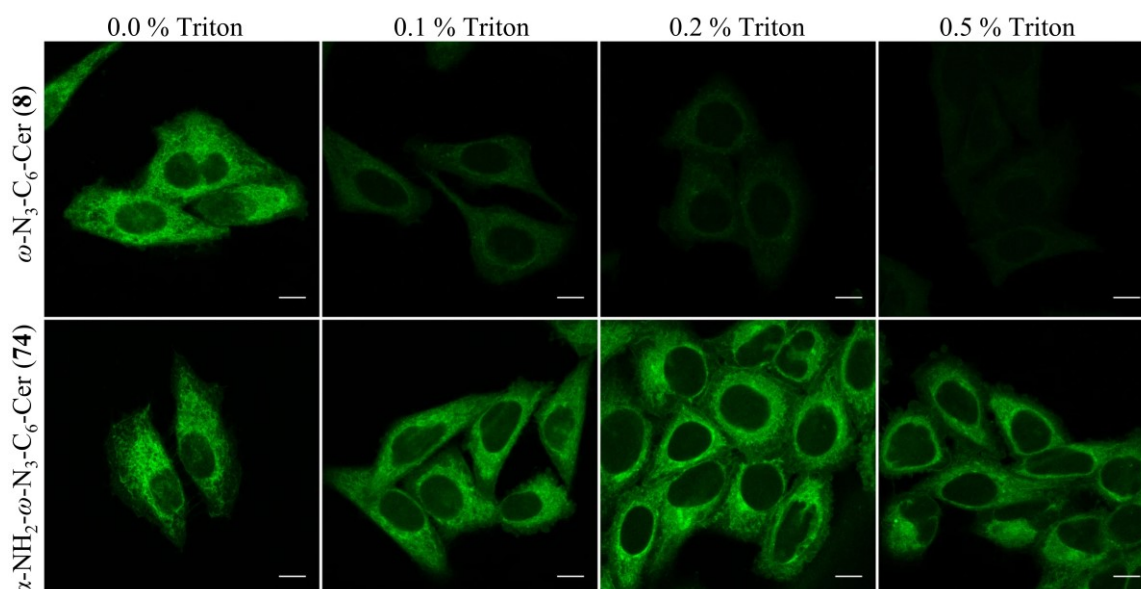
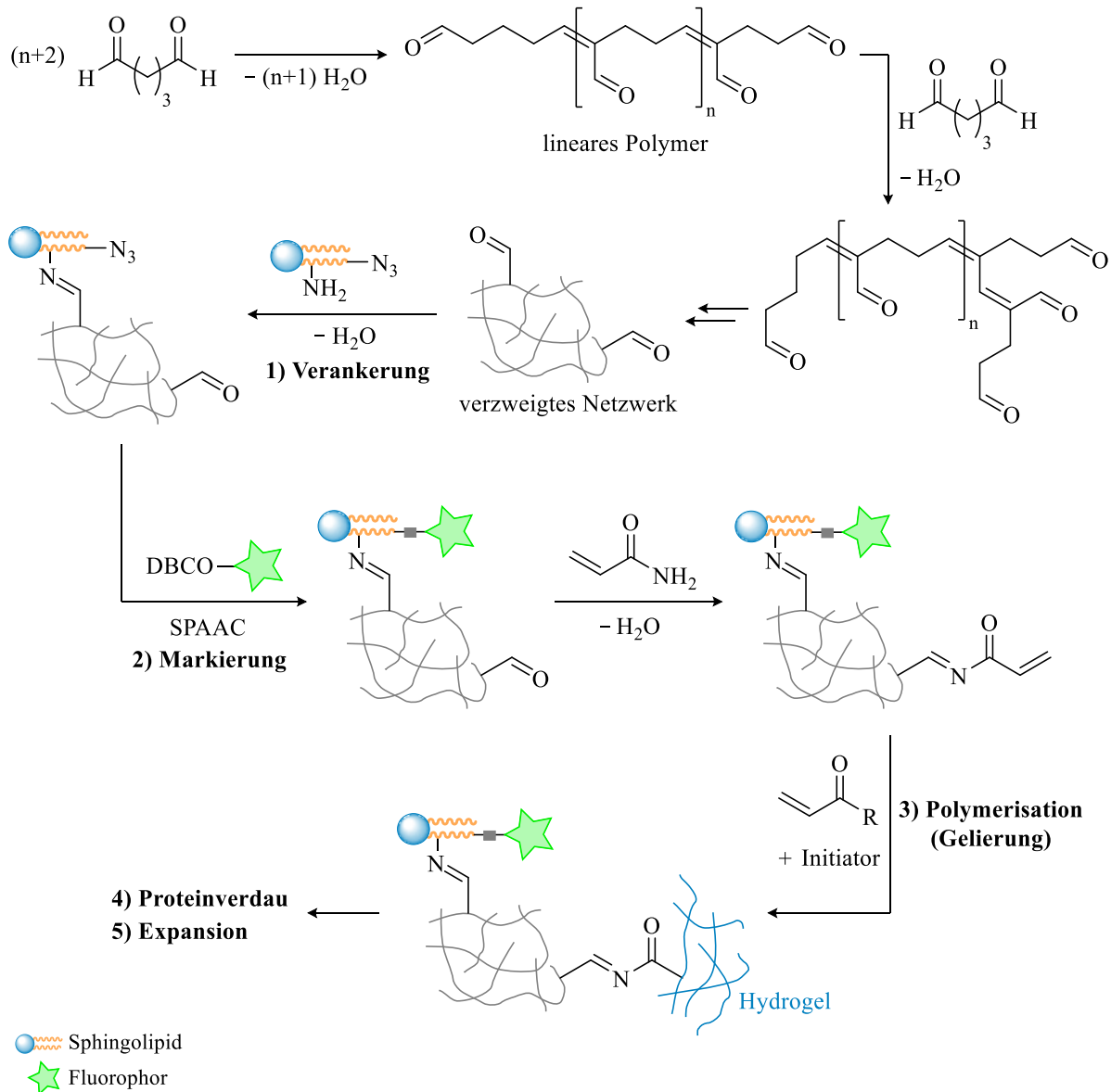


Abbildung 11: Konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HeLa229-Zellen, die mit ω -N₃-C₆-Cer (**8**) oder α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) (jeweils 10 μ M, 1 h) gefüttert, mit Glutaraldehyd (GA) fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit DBCO-Alexa Fluor 488 behandelt wurden. Beide Lipidanaloga wurden in die Plasmamembran und in Membranen intrazellulärer Organellen eingebaut. Mit zunehmender Tensidkonzentration wurde **8** effizient ausgewaschen, während das Fluoreszenzsignal von **74** aufgrund der kovalenten Vernetzung mit GA nur geringfügig abnahm. Maßstabsbalken: 10 μ m. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Ralph Götz (AG Prof. Dr. Markus Sauer, JMU Würzburg) und Dr. Tobias C. Kunz (AG Dr. Vera Kozjak-Pavlovic, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Nature Communications* entnommen und modifiziert.^[388]

Die kovalente Verknüpfung zwischen α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) und dem GA-Netzwerk, die zur Stabilität gegenüber dem Herauswaschen aus den Membranen führt, ist im Kontext der geplanten Expansionsmikroskopie (ExM) in Schema 19 dargestellt.



Schema 19: Vereinfachter Ablauf der ExM: 1) Verankerung von α -NH₂- ω -N₃-C₆-Ceramid (**74**) über eine Iminbindung an das Glutaraldehyd (GA)-Polymernetzwerk; 2) Fluoreszenzmarkierung des Sphingolipids durch Click-Reaktion mit einem DBCO-Farbstoff; 3) Zugabe von Acrylmonomeren, Verknüpfung des GA-Netzwerks mit Acrylamid über eine Iminbindung, Initiation der Hydrogel-Polymerisation durch Zugabe eines Oxidationsmittels; 4) Enzymatischer Zellverdau mittels Proteasen; 5) Expansion der Gelmatrix durch Zugabe von Wasser.

Zur Vereinfachung ist die Kondensationsreaktion zwischen dem aminmodifizierten Sphingolipid und einer Aldehydgruppe des GA-Polymernetzwerks unter Ausbildung einer Iminbindung gezeigt. Da bei den ExM-Experimenten die Zellen zunächst mit **74** gefüttert werden und anschließend

die Fixierung mit GA durchgeführt wird, besteht die Möglichkeit, dass **74** bereits mit Aldehydmonomeren oder diversen Oligomeren reagiert.^[391] Weiterhin ist zur Verankerung des Lipids in das GA-Netzwerk neben einer Kondensation auch eine 1,4-Addition an ein Michael-System denkbar.^[387] Nach der Fluoreszenzmarkierung von **74** über SPAAC erfolgt die Zugabe einer Hydrogelmonomerlösung. Das darin enthaltene Acrylamid geht ebenfalls eine kovalente Verknüpfung mit dem GA-Netzwerk ein, sodass nach der Gelierung die markierten Ceramide im Hydrogel fixiert sind. Nach Aufhebung molekularer Wechselwirkungen durch Proteasen wird die Probe mit Wasser ausgedehnt und mikroskopisch untersucht (Schema 19).

Zusammengefasst wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein bifunktionelles Ceramidderivat synthetisiert, welches zum einen die kupferfreie Konjugation mit einem Fluorophor über bio-orthogonale SPAAC und zum anderen eine stabile, kovalente Fixierung durch Glutaraldehyd in Zellproben ermöglicht. Dies erlaubte erstmals die Expansion von Sphingolipiden und hochauflösende Aufnahmen von Zellmembranen mit Hilfe einfacher Lichtmikroskopie.

Die von den Kooperationspartnern erhaltenen Ergebnisse demonstrieren, dass α -NH₂- ω -N₃-C₆-Ceramid (**74**) zur hochauflösenden Bildgebung von Zellmembranen und, in Kombination mit der Immunmarkierung, zur Visualisierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Ceramiden in 4- und 10-fach expandierten Proben verwendet werden kann (Abbildung 12). Zusätzlich können bakterielle Krankheitserreger in infizierten Zellen in einer räumlichen Auflösung dargestellt werden, die zuvor nur mit der Elektronenmikroskopie erreicht wurde (Abbildung 13).^[388]

Obwohl sich das Ceramidanalogen **74** effizient in Bakterienmembranen ansammelt, ist die Markierungsdichte intrazellulärer Membranen immer noch hoch genug, um eine nanoskalige Abbildung von Protein-Pathogen-Wechselwirkungen in infizierten Zellen zu ermöglichen. Mit einer Verdopplung der räumlichen Auflösung durch strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM) und der hohen Markierungsdichte des eingebauten Ceramidderivats **74** können 10-fach expandierte Proben mit einer geschätzten räumlichen Auflösung von 10–20 Nanometern abgebildet werden (Abbildung 14).^[388]

Dies ermöglicht eine hochaufgelöste Darstellung der inneren und äußeren Membranen von gramnegativen Bakterien in humanen Zellen, sodass das neu entwickelte Sphingolipid-ExM-Verfahren für detaillierte Studien bakterieller Infektionsmechanismen von großem Nutzen ist. Zudem zeigte α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) in HeLa229-Zellen keine zytotoxische Wirkung, was auf eine potenzielle breite Anwendbarkeit dieses molekularen Werkzeugs für die Untersuchung biologischer Prozesse in anderen Zelltypen hinweist.^[388]

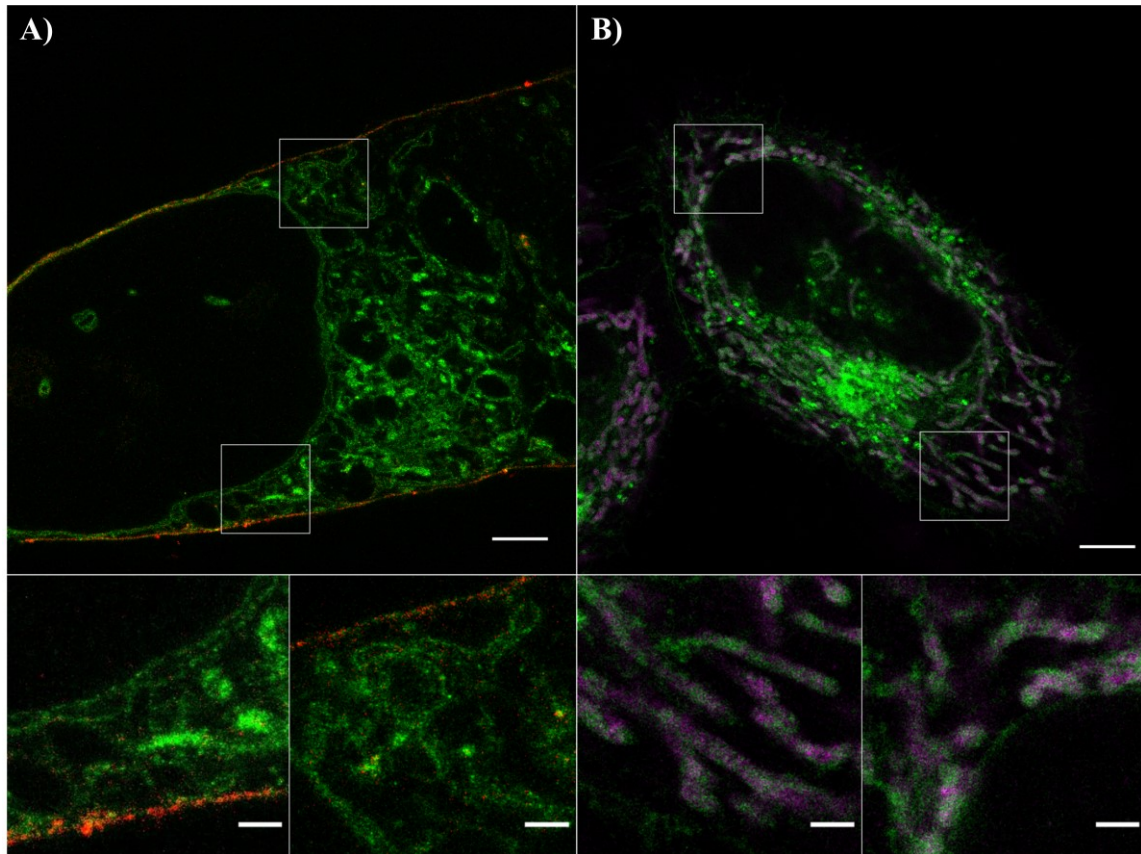


Abbildung 12: Hochaufgelöste konfokale Fluoreszenzbilder von Zellmembranen und Proteinwechselwirkungen mittels Sphingolipid-ExM. A) 10-fach expandierte HeLa229-Zellen, die mit α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) (10 μ M, 37 °C, 1 h) und ATTO643-mCling (rot) (0.5 μ M, 37 °C, 10 min) gefüttert wurden. Die Sphingolipid-Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch Click-Reaktion mit DBCO-Alexa Fluor 488 (5 μ M, 37 °C, 30 min) (grün). B) 4-fach expandierte HeLa229-Zellen, die mit α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) behandelt, fixiert und permeabilisiert wurden. Die Sphingolipid-Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit DBCO-Alexa Fluor 488 (grün). Zur Visualisierung der Mitochondrienmatrix wurde Prx3 mit ATTO 647N-verbundenen sekundären Antikörpern immunmarkiert (magenta). Maßstabsbalken: 20 μ m, 5 μ m (Zoom). Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Ralph Götz (AG Prof. Dr. Markus Sauer, JMU Würzburg) und Dr. Tobias C. Kunz (AG Dr. Vera Kozjak-Pavlovic, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Nature Communications* entnommen und modifiziert.^[388]

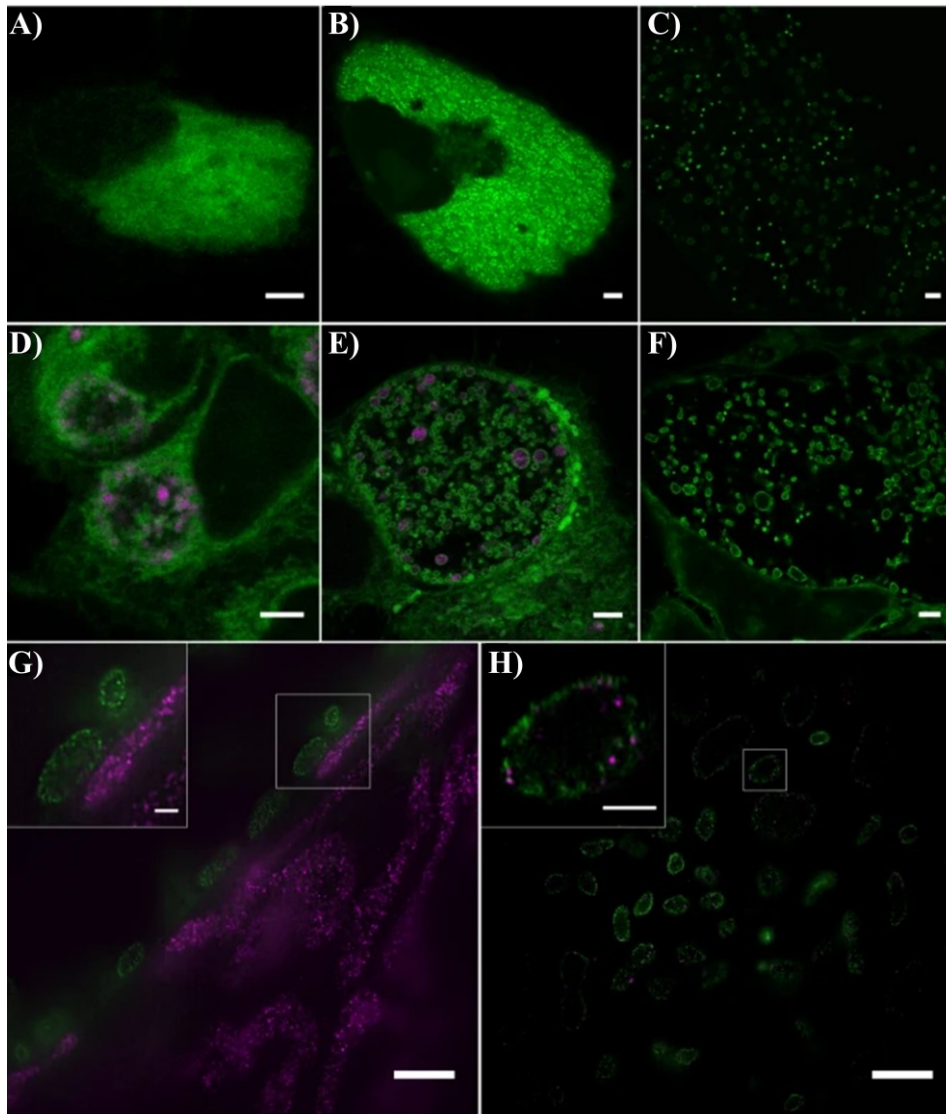


Abbildung 13: Hochaufgelöste konfokale (A–G) und SIM (H)-Fluoreszenzbilder von intrazellulären Pathogenen und deren Wechselwirkungen mit mitochondrialen Proteinen mittels Sphingolipid-ExM. A–C) HeLa229-Zellen, die mit *Simkania negevensis* infiziert (96 h), mit α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) gefüttert, fixiert, permeabilisiert und mit DBCO-Alexa Fluor 488 (grün) behandelt wurden. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Zellen vor (A), nach 4-facher (B) und 10-facher (C) Expansion. D–F) HeLa229-Zellen, die mit *Chlamydia trachomatis* infiziert (24 h), mit α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) gefüttert, fixiert, permeabilisiert und mit DBCO-Alexa Fluor 488 (grün) behandelt wurden. Die Abbildungen zeigen unterschiedliche Zellen vor (D), nach 4-facher (E) und 10-facher (F) Expansion. D, E) Chlamydiales HSP60 wurde mit ATTO 647N-Sekundärantikörper immunmarkiert (magenta). G) 10-fach expandierte Probe, bei der das mitochondrienspezifische Markerprotein Prx3 durch Immunmarkierung mit ATTO 647N-Sekundärantikörper visualisiert wurde (magenta), zeigt einen engen Kontakt zwischen Chlamydien und Mitochondrien an der Einschlussmembran. H) 10-fach expandierte Probe zeigt den Einbau von einigen Prx3-Molekülen in die Bakterienmembran. Maßstabsbalken: 5 μ m (A, D), 10 μ m (B, C, E–H), 2 μ m (G, H). Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Ralph Götz (AG Prof. Dr. Markus Sauer, JMU Würzburg) und Dr. Tobias C. Kunz (AG Dr. Vera Kozjak-Pavlovic, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Nature Communications* entnommen und modifiziert.^[388]

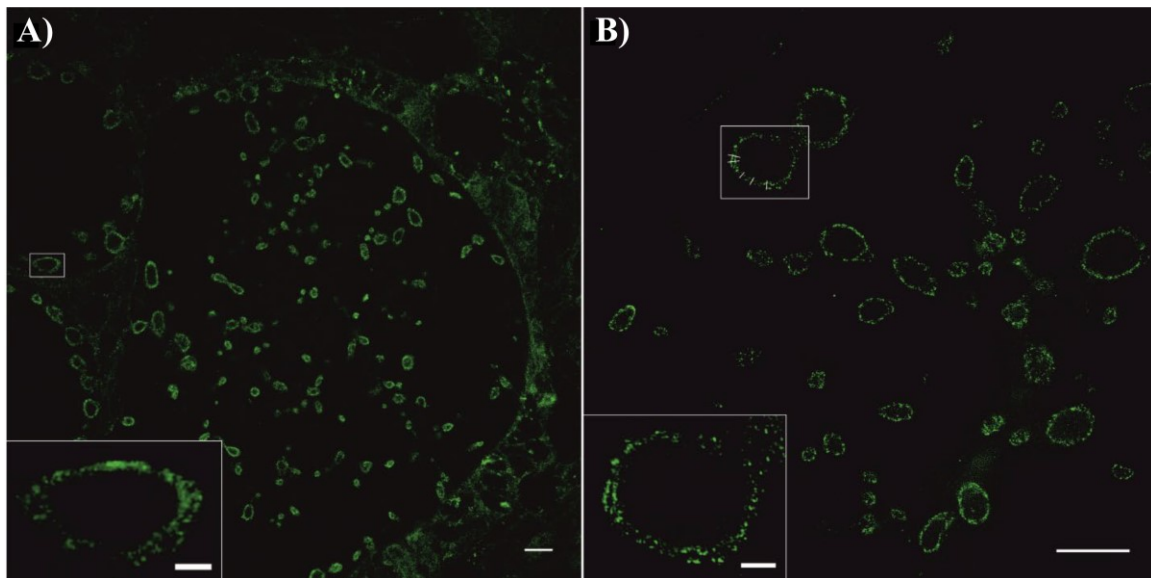


Abbildung 14: Konfokale Laserscanning- (A) und SIM-Aufnahmen (B) von infizierten HeLa229-Zellen nach 10-facher Expansion. Die Zellen wurden mit *Chlamydia trachomatis* infiziert (24 h), mit α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) (10 μ M, 37 °C, 1 h) behandelt und fixiert. Nach der Permeabilisierung erfolgte die Sphingolipid-Fluoreszenzmarkierung mit DBCO-Alexa Fluor 488 (5 μ M, 37 °C, 30 min) (grün). Die anschließende Expansion zeigt den effizienten Ceramideinbau in die äußere und innere Bakterienmembran und ermöglicht die Visualisierung des Membransystems von intrazellulären Bakterien (bestehend aus zwei Lipiddoppelmembranen). Maßstabsbalken: 10 μ m (A, B), 2 μ m (Zoom). Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Ralph Götz (AG Prof. Dr. Markus Sauer, JMU Würzburg) und Dr. Tobias C. Kunz (AG Dr. Vera Kozjak-Pavlovic, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Nature Communications* entnommen und modifiziert.^[388]

Mit Hilfe der Sphingolipid-ExM sollen zukünftig die Mechanismen von Antibiotikaresistenzen aufgeklärt werden. Aufgrund der für die meisten Antibiotika undurchlässigen Doppelmembran sind Infektionen mit multiresistenten gramnegativen Bakterien schwer zu behandeln.^[392] Die Sphingolipid-ExM-Methode mit Amino(azido)ceramid **74** fördert durch die hochauflösende Darstellung dieser Barriere die Entwicklung von Antibiotika mit verbesserter Membranpermeabilität.^[388]

In weiterführenden Experimenten sollen Sphingolipid-ExM-basierte Abbildungen feinsten Zellmembrandetails zur Untersuchung viraler Infektionsprozesse genutzt werden. Möglicherweise lassen sich Wechselwirkungen von Coronaviren mit Zellen erstmals lichtmikroskopisch in hoher Auflösung untersuchen, was die Entwicklung von neuen wirksamen antiviralen Wirkstoffen gegen SARS-CoV-2 bzw. Therapeutika gegen COVID-19 vorantreiben kann.

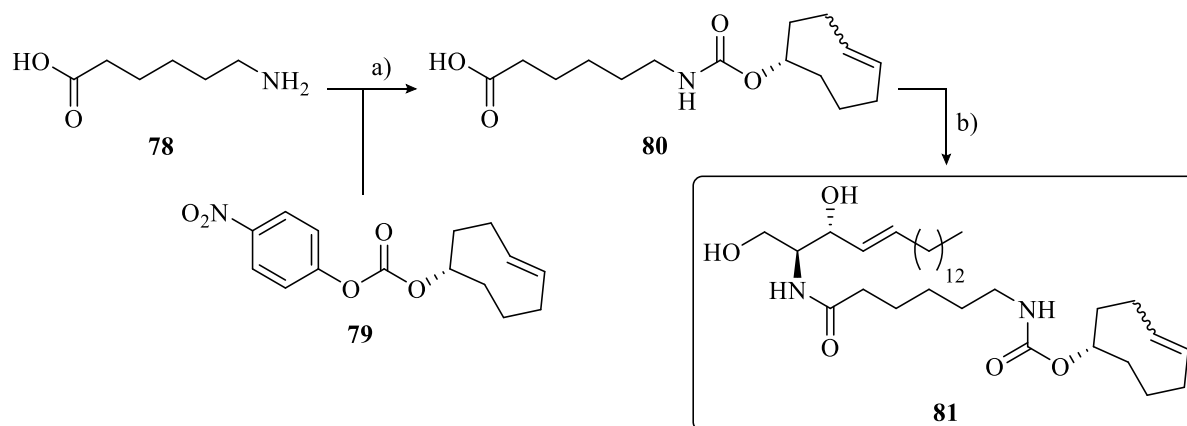
4.1.3.3 Cyclooctenfunktionalisierte Ceramide

Nach erfolgreicher Etablierung von Ceramidanaloga mit azidfunktionalisierten Seitenketten als leistungsfähige molekulare Werkzeuge zur Untersuchung zellulärer Prozesse *in vivo*, sollte die Methode der bioorthogonalen Konjugation von Sphingolipiden um die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (iEDDA) zwischen einer *trans*-Cycloocteneinheit (TCO) und Tetrazinfarbstoffen erweitert werden. Die TCO-Gruppe ist im Vergleich zur Azidgruppe zwar mit einem höheren sterischen Anspruch und einer veränderten Polarität des modifizierten Lipids verbunden, jedoch stellt die iEDDA mit gespannten Alkenen mit Geschwindigkeitskonstanten von bis zu $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ die schnellste bekannte bioorthogonale Konjugationsmethode dar.^[49] Ein weiterer Vorteil der einzusetzenden Tetrazinfarbstoffe ist deren „*turn-on*“-Effekt basierend auf ihrer fluorogenen Eigenschaft. Durch die Aufhebung der fluoreszenzlöschenden Tetrazineinheit steigt nach der Click-Reaktion die Fluoreszenz stark an, wodurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis steigt und selbst bei geringen Substanzmengen kontrastreiche Bilder mit niedriger Hintergrundfluoreszenz ohne weitere Waschprozesse erhalten werden können.^[393-395]

Im Jahr 2014 wurde von einem neuen *trans*-Cycloocten-haltigen C₆-Ceramidderivat berichtet, das zusammen mit einem Nahinfrarot-Tetrazinfarbstoff die Struktur und Dynamik des Golgi-Apparats in lebenden Zellen mit 3D-Konfokalmikroskopie und hochauflösender Mikroskopie visualisieren konnte (Kapitel 2.2.7).^[85] Basierend auf der Studie von Erdmann *et al.* sollte die Strategie der Sphingolipidmarkierung durch extrem schnelle iEDDA für Zelluntersuchungen in Kooperation mit Jan Schlegel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) adaptiert werden. Da vor allem Ceramide mit C₁₆- und C₁₈-Fettsäureresten im Zusammenhang mit vielen Krankheiten und kognitiven Beeinträchtigungen stehen, sollte neben einem cyclooctenfunktionalisierten C₆-Ceramidderivat ein langkettiges Analogon für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen dargestellt werden.^[117,396]

Vorarbeiten aus unserer Forschungsgruppe lieferten bereits ein kurzkettiges Ceramidderivat mit einer *cis*-Cyclooctenmodifikation am Ende der *N*-acylierten Seitenkette. Erste Versuche der bioorthogonalen Markierung scheiterten zum einen am eingesetzten Tetrazinfarbstoff, der nach Einlagerung in die Zellmembran zu einem unspezifischen Fluoreszenzsignal führte und zum anderen an der geringen Reaktivität des nicht aktivierten *Z*-konfigurierten Dienophils.^[190] Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten daher in Anlehnung an Erdmann *et al.* zwei, in der Seitenkettenlänge variierte, TCO-modifizierte Ceramide dargestellt werden, die durch den Abbau der Ringspannung eine iEDDA mit sehr hoher Reaktionsgeschwindigkeit ermöglichen.

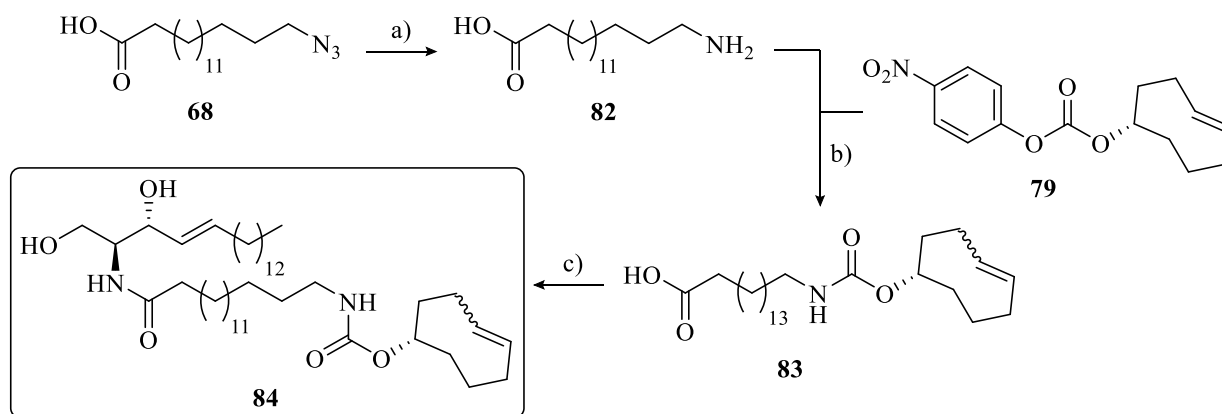
Die Syntheseroute des Cyclooctenyl-C₆-Ceramids **81** ist im nachfolgenden Schema 20 gezeigt.



Schema 20: Durchgeführte Synthese von Cyclooctenyl-C₆-Ceramid (**81**) ausgehend von ω -Aminosäure **78** und TCO-Aktivester **79**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) DIPEA, DMF, RT, 3 d, 79 %; b) *Variante 1:* **1**, EDC-HCl, HOBt·H₂O, DIPEA, 0 °C, 1 h, dann RT, 18 h, 73 %; *Variante 2:* **1**, HBTU, DIPEA, DMF, 0 °C→RT, 4 h, 87 %.

Im ersten Schritt wurde 6-Aminohexansäure (**78**) in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) mit dem TCO-haltigen Kohlensäureester **79** unter basischen Bedingungen versetzt. Da **78** eine geringe Löslichkeit aufwies, wurde die erhaltene Suspension insgesamt drei Tage bei Raumtemperatur gerührt, bis eine klare Lösung entstand. Der Reaktionsfortschritt konnte visuell verfolgt werden, da sich das Gemisch durch die nukleophile Abspaltung des *para*-Nitrophenols gelb färbte. Nach wässriger Aufarbeitung, Extraktion mit Essigsäureethylester und anschließender säulenchromatographischer Reinigung wurde Carbamat **80** mit einer Ausbeute von 79 % isoliert (Schema 20). Die erhaltenen NMR-spektroskopischen Daten der Cyclooctenverbindung **80** entsprechen denen aus der Literatur und deuten bei genauerer Betrachtung auf ein *E/Z*-Isomerengemisch hin, welches sich durch einfache Flüssigchromatographie an Kieselgel nicht trennen lässt.^[393,397] Da Verbindung **80** bereits in vorangegangenen Arbeiten aus unserer Forschungsgruppe erfolgreich Anwendung in der bioorthogonalen Modifikation von Mikrotubuli-stabilisierendem Docetaxel zur hochauflösenden Visualisierung des Zytoskeletts durch iEDDA mit einem Tetrazinfluorophor fand, wurde die *N*-Acylierung von Sphingosin (**1**) zu Ceramid **81** ebenfalls mit dem isolierten Gemisch durchgeführt.^[393,397] Die Amidkupplung der Säure **80** und Sphingosin (**1**) mit einem EDC/HOBt-System lieferte das kurzkettenige Cycloocten-C₆-Ceramid (**81**) mit einer Ausbeute von 73 %, während die Verwendung von HBTU als Kupplungsreagenz zu einer erhöhten Ausbeute von 87 % führte (Schema 20).

Im Anschluss erfolgte ebenfalls unter Verwendung von TCO-Aktivester **79** die Synthese des langkettigen cyclooctenfunktionalisierten C₁₆-Ceramidderivats **84**. Die benötigte 16-Aminohexadecansäure (**82**) wurde zuvor aus dem entsprechenden Azid **68** dargestellt (Schema 21).



Schema 21: Durchgeführte Synthese von Cyclooctenyl-C₁₆-Ceramid (**84**) ausgehend von azidfunktionalisierter Säure **68** und TCO-Carbonat **79**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H₂, Pd/C, MeOH, RT, 3 d, 54 %; b) DIPEA, NEt₃, DMF/H₂O, 50 °C, 20 h, 53 %; c) **1**, HBTU, DIPEA, DMF, 0 °C→RT, 3 h, 85 %.

Die Reduktion des Azids **68** zum Amin **82** erfolgte durch heterogene Katalyse mit elementarem Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle. Aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaft und der damit verbundenen schlechten Löslichkeit, fiel das gebildete Produkt im verwendeten Methanol bei Raumtemperatur als farbloser Feststoff aus, der anschließend vom Katalysator getrennt werden musste. Um die Löslichkeit der Aminosäure **82** in Methanol zu erhöhen, wurde das Gemisch zum Sieden erhitzt und zur Abtrennung des Katalysators heiß über Celite filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels aus dem Filtrat wurde Säure **82** mit einer Ausbeute von 54 % erhalten (Schema 21).

Die ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopischen Analysen deuten auf eine erfolgreiche Reduktion der Azidgruppe hin. Für eine verbesserte Löslichkeit der amphiphilen ω-Aminosäure **82** wurde bei den Messungen ein Tropfen NaOD (40 Gew.-% in D₂O) pro Milliliter deuteriertem Methanol (CD₃OD) zugegeben. Im ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) erscheint das Signal der beiden Protonen am N-gebundenen Kohlenstoffatom (*H*-16) bei einer chemischen Verschiebung von 2.61 ppm als Triplett mit einer Kopplungskonstanten von ³J_{16,15} = 7.2 Hz. Die Resonanzfrequenz dieser Protonen ist im Vergleich zu den entsprechenden Protonen des Azids **68** hochfeldverschoben. Dies ist auf eine Erhöhung der Elektronendichte an den betrachteten Wasserstoffkernen und deren stärkere Abschirmung durch den +M-Effekt der Aminogruppe mit freiem Elektronenpaar zurückzuführen.^[398] Im ¹³C-NMR-Spektrum ist dieser Trend des Hochfeldshifts bedingt durch den positiven mesomeren Effekt der NH₂-Gruppe ebenfalls zu beobachten. Das Kohlenstoffatom *C*-16 resoniert nach der Reduktion zum Amin bei 42.7 ppm, während es zuvor bei Azid **68** (gemessen in CDCl₃) ein Signal bei einer höheren chemischen Verschiebung von 51.6 ppm generiert.

Die aminofunktionalisierte Hexadecansäure **82** wurde mit TCO-Aktivester **79** zu Carbamat **83** umgesetzt, wobei die Reaktionstemperatur zur Steigerung der Löslichkeit von **82** auf 50 °C erhöht wurde. Wie bereits bei der Synthese des kurzkettigen Cyclooctenylcarbamats **80** zu beobachten, wurde auch die langkettige Verbindung **83** als *E/Z*-Isomerengemisch erhalten. Daraufhin erfolgte die HBTU-vermittelte Amidkupplung von **83** mit Sphingosin (**1**) in DMF unter basischen Bedingungen. Das cyclooctenfunktionalisierte C₁₆-Ceramidderivat **84** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 85 % isoliert (Schema 21).

Die erfolgreiche Darstellung von Cyclooctenylceramid **84** wurde durch Detektion der einfach positiv geladenen monomeren und dimeren Natriumaddukte im aufgenommenen ESI-Massenspektrum bestätigt. Das [M+Na]⁺-Signal wurde bei m/z 727.5970 (berechnet: m/z 727.5959) mit einer hohen Massengenauigkeit von Δm/z = 1.4 ppm beobachtet, während der Peak für [2M+Na]⁺ bei m/z 1432.2019 (berechnet: m/z 1432.2027) eine noch höhere Genauigkeit von Δm/z = 0.5 ppm zeigte.

In nachfolgenden Experimenten sollen die beiden synthetisierten Ceramidderivate **81** und **84** mit geeigneten Tetrazinfarbstoffen für die hochauflösende Mikroskopie zur Visualisierung von Sphingolipiddynamiken in lebenden Zellen eingesetzt werden. Eine Signalverstärkung wird möglicherweise durch die Verwendung eines besonders reaktiven Pyrimidyltetrazins erreicht (Abbildung 15), da sowohl die gespannte *trans*- als auch die unreaktive *cis*-Cycloocteneinheit adressiert wird. Die stark elektronenziehende Gruppe am Tetrazin führt zur Absenkung des LUMO-Energieniveaus und somit zu höheren Reaktionsraten der iEDDA mit Dienophilen. Entsprechende Fluorophore ermöglichten bereits die bioorthogonale Markierung von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Nukleotiden mit unreaktiven terminalen Alkenylgruppen.^[399-403]

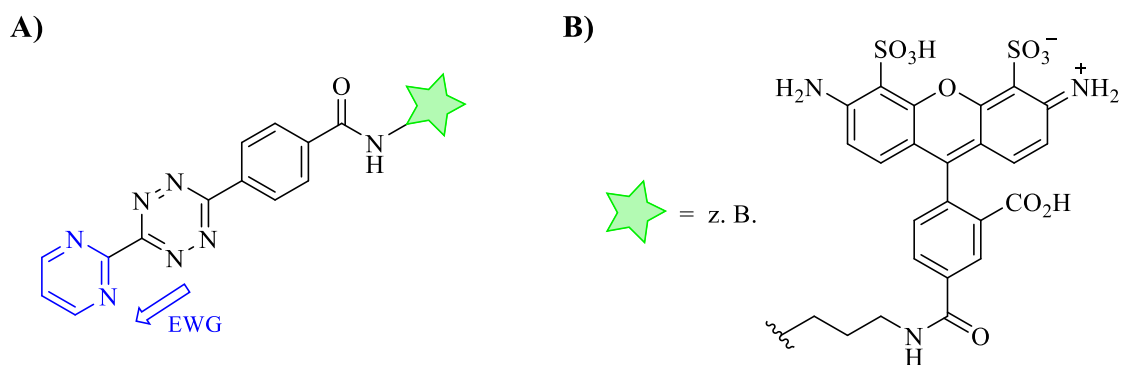
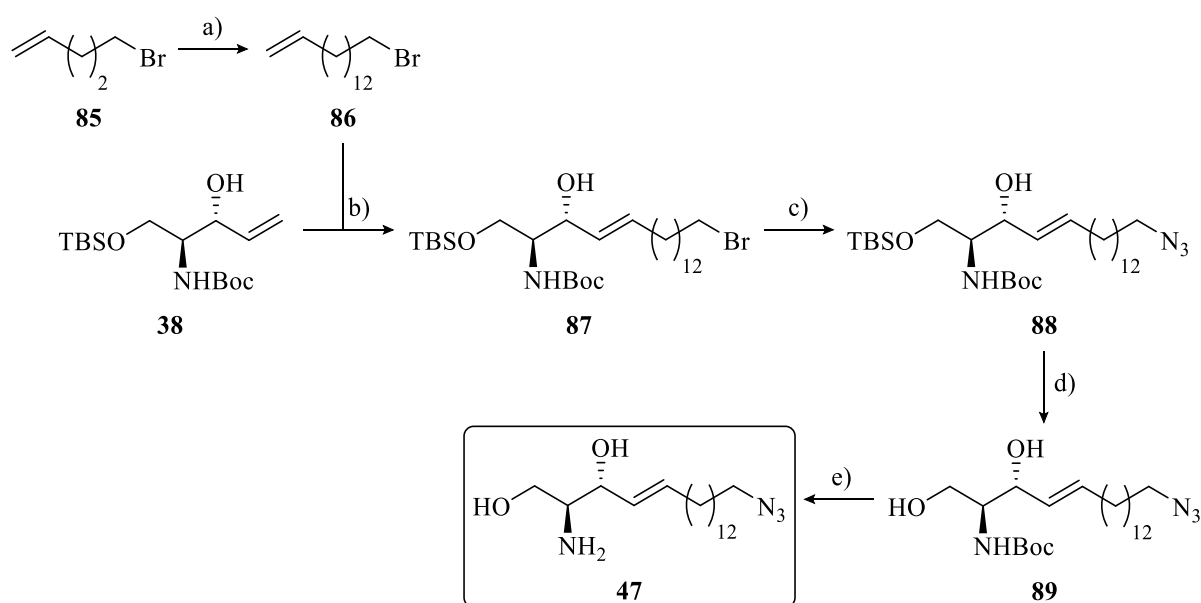


Abbildung 15: A) Vereinfachte Darstellung eines Fluorophors mit Pyrimidyltetrazin-Linker, der selbst mit unreaktiven Alkenen eine iEDDA-Reaktion eingeht. (EWG: elektronenziehende Gruppe). B) Molekülstruktur der Alexa Fluor 488-Einheit.

4.1.3.4 ω -Azidosphingosin

Bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipide mit Azid- und *trans*-Cyclooctenmodifikationen an den *N*-acylierten Seitenketten stellen effiziente Werkzeuge zur Visualisierung von Lipiddynamiken in zellulären Kompartimenten mittels kupferfreier Click-Reaktionen dar. Der größte Nachteil der entsprechenden Ceramidderivate ist ihre potenzielle enzymatische Umsetzung durch Ceramidasen, wobei die funktionalisierten Fettsäurereste abgespalten werden können und die Markierung somit erheblich an Sphingolipidspezifität verliert. Um dieses Problem zu verhindern, sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Sphingosinanalogen synthetisiert werden, bei dem die Azidgruppe am Sphingolipidrückgrat lokalisiert ist. Durch Einführung der Click-Funktionalität an C-18 wird eine möglichst geringe Änderung der biologischen Eigenschaften angestrebt, während enzymatische Vorgänge am polaren Kopfmotiv gewährleistet werden.

Die Darstellung von ω -Azidosphingosin (**47**) wurde in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten aus unserer Forschungsgruppe durchgeführt (Schema 22).^[282,283] Ziel war neben der Überprüfung der Reproduzierbarkeit, ausreichende Substanzmengen des azidmodifizierten Biomoleküls als funktionalisierte Sphingoidbase sowie als Baustein komplexer Sphingolipide für verschiedene Projekte interdisziplinärer Kooperationen zu erhalten.



Schema 22: Durchgeführte Synthese von ω -N₃-Sphingosin (**47**) ausgehend von Allylalkohol **38** und Alken **86** via Olefinmetathese als Schlüsselschritt zum Aufbau des C₁₈-Grundgerüsts. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Mg, THF, RT→60 °C, 4 h, dann 1,10-Dibromdecan, Li₂CuCl₄, NMP, THF, 0 °C→RT, 20 h, 66 %; b) Grubbs II-Kat., DCM, 50 °C, 2 h, 50 %; c) NaN₃, DMF, 70 °C, 18 h, 99 %; d) TBAF, THF, 0 °C→RT, 30 min, quant.; e) TFA, DCM, 0 °C, 2.5 h, 64 %.

Zunächst wurde das für die Metathese benötigte Olefin **86** ausgehend von 5-Brompenten (**85**) über eine kupferkatalysierte Alkylierungsreaktion der entsprechenden Grignard-Verbindung mit einer Ausbeute von 66 % dargestellt. Das eingesetzte 1-Methylpyrrolidin-2-on (NMP) erhöht bei dieser Art der Alkylierung sowohl die Chemoselektivität als auch die Ausbeute.^[404] Der Aufbau des C₁₈-Rückgrats der (*E*)-konfigurierten Verbindung **87** erfolgte ausgehend von Bromalken **86** und dem zuvor synthetisierten Allylalkohol **38** durch Olefinkreuzmetathese unter Verwendung des Grubbs II-Katalysators. Die Einführung der bioorthogonalen Azidfunktion gelang über eine Substitutionsreaktion mit Natriumazid, wobei **88** mit exzellenter Ausbeute von 99 % erhalten wurde. Anschließend erfolgte die selektive Abspaltung der Silylschutzgruppe mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) in quantitativer Weise. Im letzten Schritt wurde Carbamat **89** mittels Trifluoressigsäure (TFA) zu Amin **47** umgesetzt. Wie bei Sphingosin (**1**) (Kapitel 4.1.2) kam es aufgrund des Allylalkoholmotivs zur Bildung von nicht charakterisierten Nebenprodukten. Nach basischer Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung wurde das gewünschte Azid **47** mit 64 % Ausbeute isoliert (Schema 22).

Die erhaltenen NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten entsprechen den bereits bekannten Werten aus vorangegangenen Arbeiten innerhalb unserer Forschungsgruppe und bestätigen somit die erfolgreiche Synthese des clickbaren Sphingosinderivats **47**.^[282,283]

In einem Projekt von Dr. Judith Lang aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl Sebastian Lang (Universität Duisburg-Essen) wurde ω -Azidosphingosin (**47**) zur Untersuchung der antiviralen Eigenschaft von Makrophagen eingesetzt. Diese Fresszellen besitzen als Teil des Immunsystems wichtige Schutzfunktionen während der Infektion mit Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), der zu den umhüllten DNA-Viren gehört und insbesondere Schleimhäute im oralen und perioralen Bereich befällt.^[405] Bislang sind die molekularen Mechanismen, welche zur Einschränkung der Virusvermehrung führen und somit vor schweren Krankheiten schützen, nicht vollständig geklärt. Ein wichtiger Ansatzpunkt dazu lieferte die von Lang *et al.* durchgeführte Studie, die zeigt, dass Makrophagen HSV-1 über Endozytose aufnehmen und die Virionen in multivesikuläre Körperchen (MVBs) transportieren. In MVBs, welche komplexe membranreiche Organellen des Zytoplasmas darstellen, wird Ceramid durch saure Ceramidase (aCDase) in Sphingosin umgewandelt. Dadurch kommt es in den MVBs zu einer erhöhten Bildung von sphingosinreichen intraluminalen Vesikeln (ILVs). Sobald nun HSV-1-Partikel die MVBs erreichen, binden diese sphingosinreichen ILVs an die Viruspartikel, was die Fusion mit der limitierenden endosomalen Membran einschränkt und die Zellinfektion verhindert.^[406]

Die von Dr. Judith Lang aufgenommenen Konfokalmikroskopieaufnahmen der durchgeführten Zellexperimente zeigen eine Akkumulation von Sphingosin in ILVs mit deutlicher HSV-1-Colokalisation (Abbildung 16). Somit interagiert Sphingosin von ILVs tatsächlich mit HSV-1.^[406]

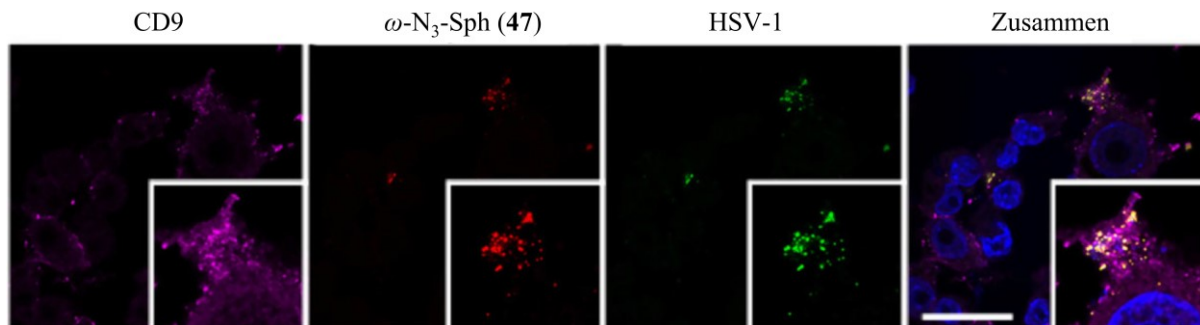


Abbildung 16: Colokalisationsexperimente (Konfokalmikroskop) in, aus Knochenmark stammenden, Wildtyp-Makrophagen (BMDMs), welche 3 h mit ω -N₃-Sphingosin (**47**) (100 μ M) versetzt und 30 min mit HSV-1 infiziert wurden. Die BMDMs wurden daraufhin mit CD9 (ILVs-Marker) (lila), HSV-1 anti-Kapsid (grün) und Hoechst (Zellkernmarker) (blau) durch Immunfluoreszenz angefärbt. Die Visualisierung von **47** erfolgte durch Click-Reaktion mit DBCO-Cy3 für 7 min bei RT (rot). Durch Übereinanderlegen der Bilder wird die Sphingosinakkumulation in ILVs und deren Colokalisation mit HSV-1 deutlich. Maßstabsbalken: 20 μ m. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Judith Lang (AG Prof. Dr. Karl S. Lang, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Nature Communications* entnommen und modifiziert.^[406]

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass in Makrophagen die aCDase-katalysierte Spaltung von Ceramid zu einem erhöhten Sphingosingehalt in intraluminalen Vesikeln (ILVs) der multivesikulären Körperchen (MVBs) führt und dies das Eindringen von HSV-1-Kapsiden in das Zytoplasma verhindert. Eine systematische Erhöhung der Sphingosinkonzentration, z. B. durch die Zugabe von Sphingosin, saurer Ceramidase (aCDase), Sphingomyelinase und Sphingosinkinaseinhibitor 2 (SKI-II), hemmte in weiteren Experimenten die HSV-1-Vermehrung in Makrophagen.^[406] Darüber hinaus wird aCDase in mehreren anderen Geweben exprimiert, vor allem in Lunge, Dickdarm, Magen und Milz. Somit schützen sich Zellen in diesen Organen vermutlich ebenfalls durch die Expression von aCDase in MVBs gegen eindringende Viren. Dieser Zusammenhang soll zukünftig neue Therapien gegen virale Infektionen auf Basis des Sphingolipidmetabolismus und durch gezielte Erhöhung des Sphingosingehalts ermöglichen.

In einem weiteren Projekt wurde von Dr. Franziska Solger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Rudel (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) unter Verwendung des Azids **47** die Rolle von Sphingosin beim Überleben von intrazellulären Gonokokken untersucht.^[407,408] Das humanpathogene Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* ist in der Lage in verschiedene Schleimhautgewebe einzudringen und diese zu infizieren. In manchen Fällen kommt es zur Verbreitung im Blutkreislauf, was systemisch disseminierte Gonokokkeninfektionen mit schwerwiegenden Folgen wie Endokarditis und Arthritis verursachen kann.^[409] Das gramnegative Bakterium stellt mit 106 Millionen Fällen pro Jahr die zweithäufigste bakterielle Ursache für sexuell übertragbare Krankheiten dar. Eine alarmierende Entwicklung ist das derzeitige Auftreten von multi-resistenten *Neisseria*-Stämmen, was *N. gonorrhoeae* als neuen „Superbug“ einstuft.^[410] Die Entwicklung neuer wirksamer Antibiotika ist daher von großem medizinischen Interesse. In diversen Studien wurden bereits bakterizide Eigenschaften von Sphingoidbasen wie Sphingosin gezeigt.^[179,181,189] Jedoch wurden diese Daten durch Inkubation von pathogenen Bakterien mit unterschiedlichen Sphingosinkonzentrationen in Kulturmedien erhalten, sodass eine direkte Interaktion von Sphingosin mit den Bakterien in ihren Wirtszellen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Um Hinweise für den genauen Wirkmechanismus zu erhalten und den Einfluss von Sphingosin auf das Bakterienwachstum in Zellen zu untersuchen, sollte daher das clickbare ω -N₃-Sphingosin (**47**) kombiniert mit Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

Massenspektrometrische Untersuchungen von Dr. Fabian Schumacher aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) bestätigten die Identität des verwendeten Azidolipids **47** aufgrund der genauen Masse-zu-Ladungsverhältnisse der detektierten Moleküle (Abbildung 17 A).^[408] Um den potenziellen Metabolismus von **47** zu untersuchen, wurden von den Kooperationspartnern die Inkubation mit humaner Sphingosinkinase 1 (SphK1) sowie die anschließende massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Das enzymatisch synthetisierte ω -Azidosphingosin-1-phosphat (**44**) wurde durch seine protonierte Spezies, begleitet von Natrium- und Kaliumaddukten, im Massenspektrum mit hoher Massengenauigkeit nachgewiesen (Abbildung 17 B).^[408]

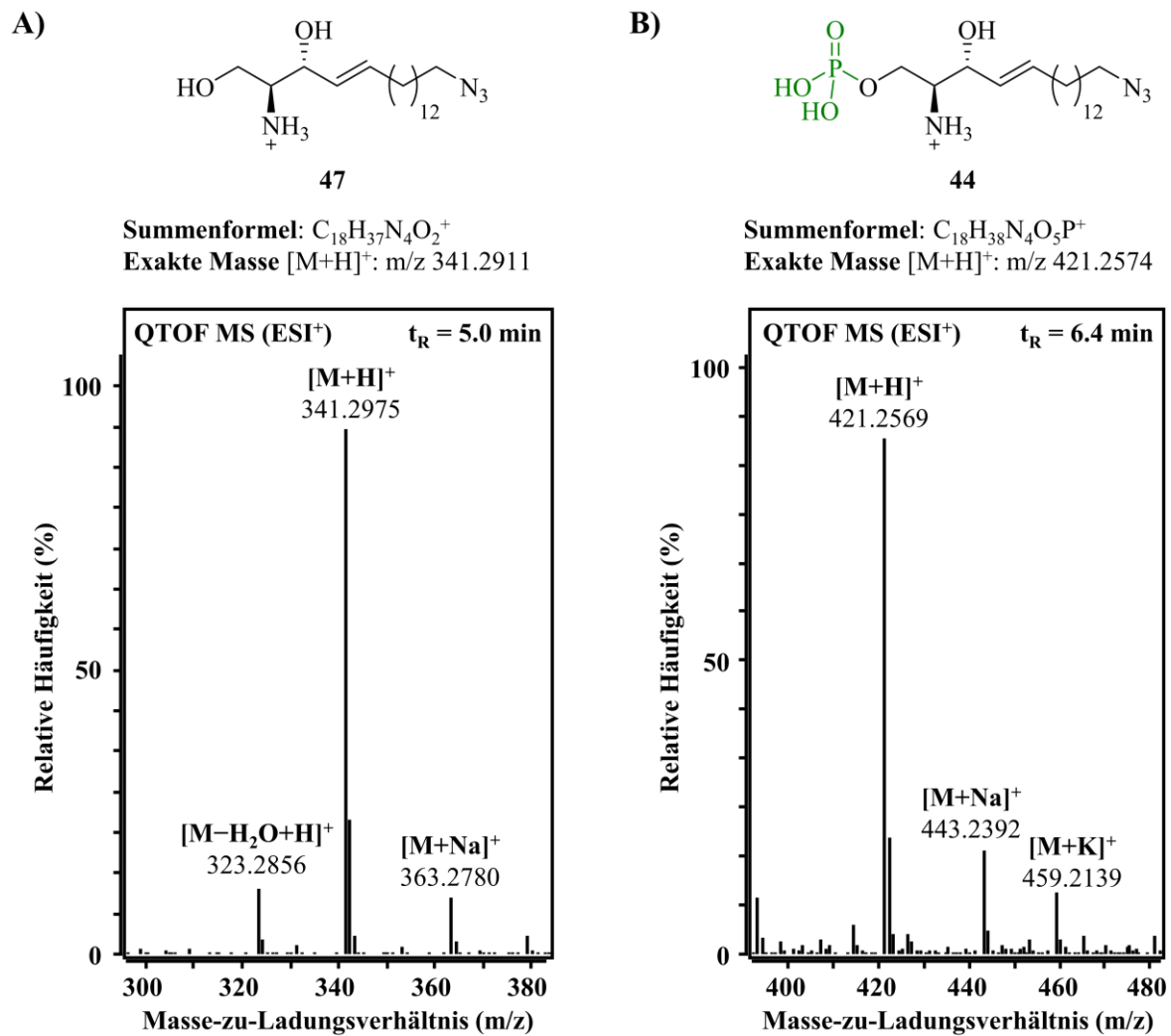


Abbildung 17: A) LC-HRMS-Verifikation des eingesetzten ω -N₃-Sphingosins (**47**). B) LC-HRMS-Detektion von ω -N₃-S1P (**44**), dessen Bildung durch SphK1 *in vitro* katalysiert wird. Lipidextrakte wurden dafür nach der Inkubation von **47** mit SphK1 und ATP in einem zellfreien Metabolismusassay mittels HPLC getrennt und massenspektrometrisch (ESI⁺) analysiert. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* entnommen und modifiziert.^[408]

Nachdem im *in vitro*-Kinaseassay die Phosphorylierung von ω -Azidosphingosin (**47**) bestätigt wurde, sollte die Substratakzeptanz von SphK1 in humanen Zellen untersucht werden. Hierfür wurden von Dr. Fabian Schumacher Lipidextrakte von epithelialen Bindehautzellen (Chang-Zellen), welche zuvor mit Azid **47** inkubiert worden sind, mittels LC-MS/MS analysiert. Sowohl das Ausgangssubstrat als auch das Biosyntheseprodukt ω -N₃-S1P (**44**) wurden in den Zelllipidextrakten nachgewiesen (Abbildung 18).^[408]

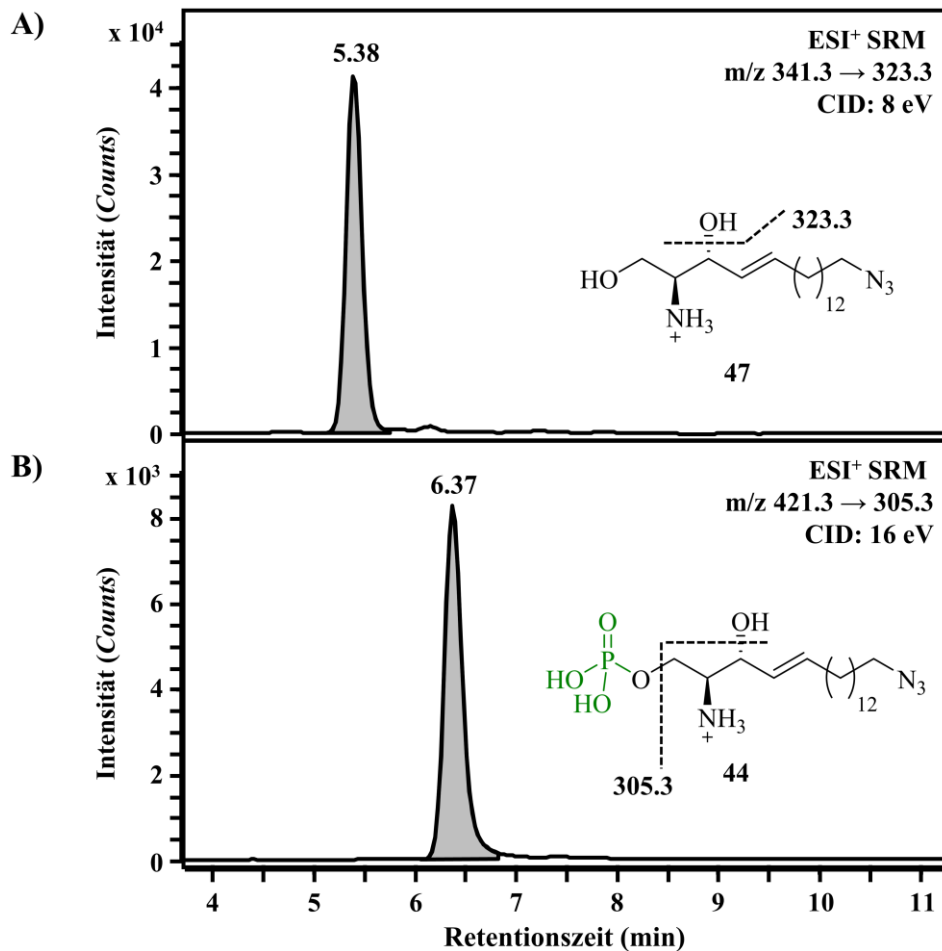


Abbildung 18: LC-MS/MS-Detektion von ω -N₃-S1P (**44**) nach der Inkubation von Chang-Zellen mit **47** (10 μ M) für 17 h. Sowohl **47** (A) als auch das phosphorylierte Metabolisierungsprodukt **44** (B) wurden in den Lipid-extrakten nachgewiesen. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* entnommen und modifiziert.^[408]

Um eine mögliche Aufnahme von ω -N₃-Sphingosin (**47**) in intrazelluläre Bakterien zu untersuchen, wurden von Dr. Franziska Solger Chang-Zellen mit **47** gefüttert und mit *Neisseria gonorrhoeae* infiziert. Nach der bioorthogonalen Click-Reaktion mit DIBO-Alexa Fluor 488 (DIBO-488) zeigten die Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie eine deutliche Colokalisation zwischen **47** und den Gonokokken in den infizierten Zellen (Abbildung 19). Die Neisserien waren in der Lage das Sphingosinderivat effizient aus der Wirtszelle aufzunehmen und spezifisch in ihre Membranen einzubauen.^[407,408]

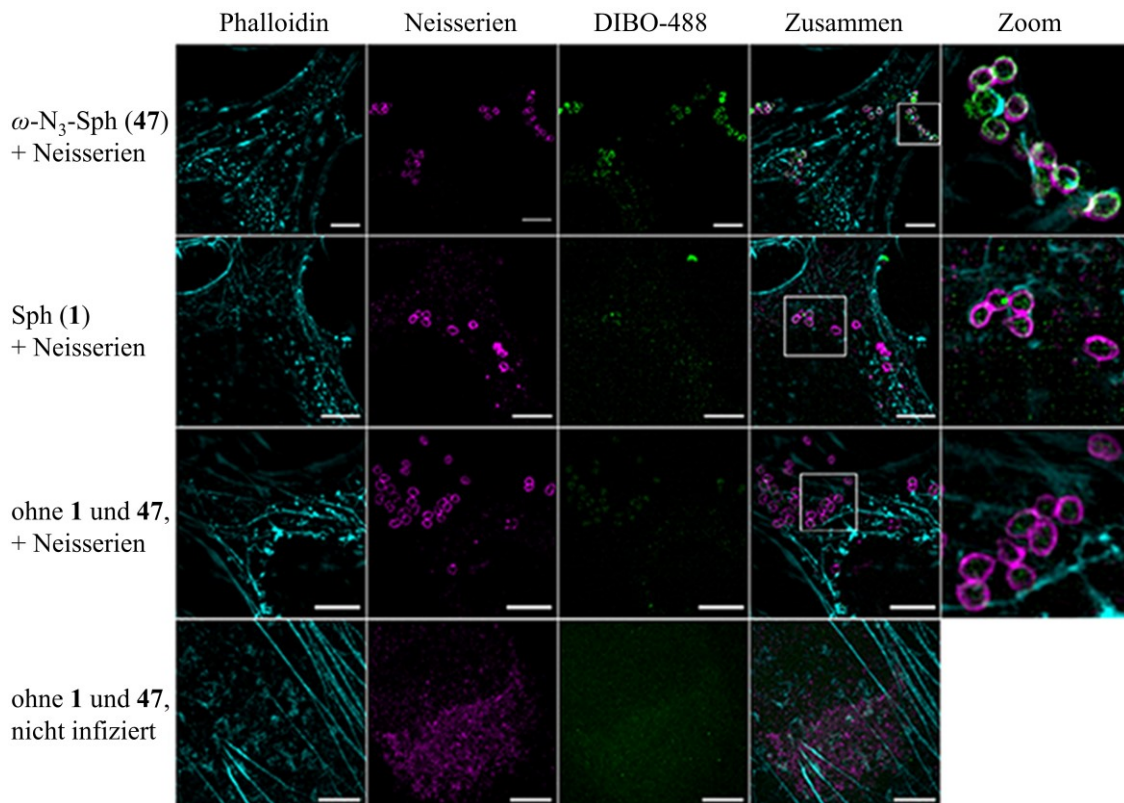


Abbildung 19: Aufnahmen der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (SIM) zeigen Inkorporation und gleichmäßige Verteilung von ω -N₃-Sphingosin (47) in die Neisserienmembran in infizierten Chang-Zellen. Die Zellen wurden 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 10 μ M ω -N₃-Sph (47) oder Sphingosin gefüttert, 4 h mit den Bakterien infiziert und dann für die Click-Reaktion 30 min mit DIBO-Alexa Fluor 488 behandelt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mittels Alexa Fluor 555-Phalloidin visualisiert, während die Neisserien mit polyklonalem ATTO 647-Primärantikörper immunmarkiert wurden. Maßstabsbalken: 5 μ m. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Franziska Solger (AG Prof. Dr. Thomas Rudel, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* entnommen und modifiziert.^[408]

Vorangegangene Studien zeigten, dass die Inkubation von grampositiven und gramnegativen Bakterien mit Sphingoidbasen in deren Assoziation mit den Bakterienmembranen resultieren.^[181,189] Beweise für eine Assoziation von Sphingosin mit intrazellulären Bakterien fehlten bislang. Die von Solger *et al.* durchgeführte Studie ermöglichte mit Hilfe von ω -N₃-Sphingosin (47) und der Fluoreszenzmikroskopie erstmals die Visualisierung der Sphingosinaufnahme in die Membran von intrazellulären Gonokokken.^[407,408]

In weiterführenden Experimenten sollte in Kooperation mit Dr. Ralph Götz (AG Prof. Dr. Markus Sauer), Dr. Tobias C. Kunz (AG Dr. Vera Kozjak-Pavlovic) und Dr. Franziska Solger (AG Prof. Dr. Thomas Rudel) (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) das Azidosphingosin 47 mittels Expansionsmikroskopie (ExM) für eine höhere räumliche Auflösung sorgen und detaillierte Einblicke in bakterielle Infektionsprozesse liefern.

In Analogie zum bifunktionellen Sphingolipidderivat α -NH₂- ω -N₃-C₆-Cer (**74**) eignet sich **47** aufgrund der primären Aminofunktion ebenfalls für eine Fixierung im schwellbaren Hydrogel (Kapitel 4.1.3.2). Die von den oben genannten Kooperationspartnern erhaltenen Aufnahmen der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (SIM) von infizierten Zellen nach vierfacher Expansion zeigen den Einbau von ω -N₃-Sphingosin (**47**) in die Membranen intrazellulärer Bakterien mit hoher räumlicher Auflösung (Abbildung 20).^[388,407]

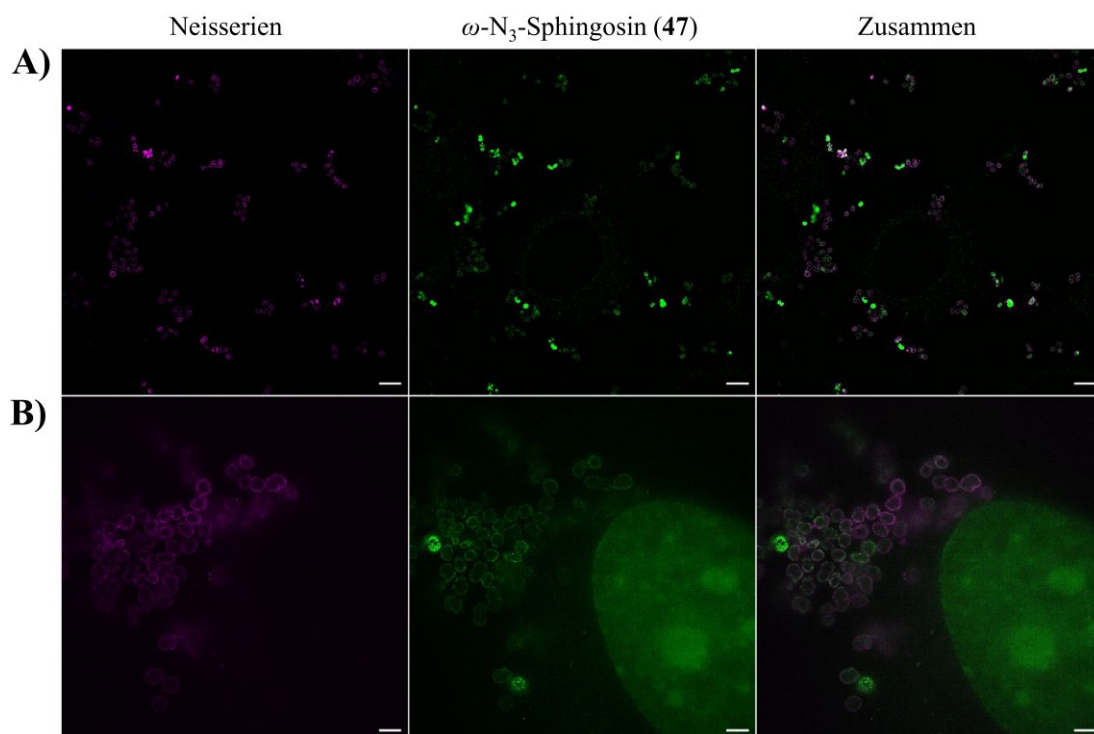


Abbildung 20: Konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen vor der Expansion (A) und SIM-Aufnahmen nach 4-facher Expansion (B) von Chang-Zellen, die mit ω -N₃-Sphingosin (**47**) (10 μ M, 37 °C, 1 h) gefüttert und 4 h mit *N. gonorrhoeae* infiziert wurden. Nach Fixierung und Permeabilisierung erfolgte die Visualisierung von **47** via Click-Reaktion mit DIBO-Alexa Fluor 488 (5 μ M, 37 °C, 30 min) (grün), während die Neisserien mit ATTO 647N-Sekundärantikörper immunmarkiert wurden (magenta). Die ExM-Bilder zeigen deutlich die Aufnahme von **47** in die Neisseriamembran. Maßstabsbalken: 5 μ M (A), 4 μ M (B). Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Ralph Götz (AG Prof. Dr. Markus Sauer, JMU Würzburg), Dr. Tobias C. Kunz (AG Dr. Vera Kozjak-Pavlovic, JMU Würzburg) und Dr. Franziska Solger (AG Prof. Dr. Thomas Rudel, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Nature Communications* entnommen und modifiziert.^[388]

Zusammengefasst liefern die erhaltenen Daten weitere Hinweise zur antibakteriellen Wirkung von Sphingosin, dessen Einbau in die Neisserienmembran möglicherweise zu Mikroläsionen und somit zum Zelltod der Bakterien führt.^[408] Einer aktuellen Studie zufolge resultiert die bakterizide Aktivität von Sphingosin gegenüber den Pathogenen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* aus der Protonierung der NH₂-Gruppe. Die protonierte Aminofunktion

bindet an das negativ geladene Lipid Cardiolipin in den bakteriellen Plasmamembranen und führt zu einer deutlichen Abnahme der Membranfluidität. Dies führt zu einer schnellen Permeabilisierung, zum Verlust von ATP sowie der bakteriellen Stoffwechselaktivität und schließlich zum Tod der Bakterien.^[191] ω -Azidosphingosin (**47**) stellt in Kombination mit der Expansionsmikroskopie ein leistungsstarkes Werkzeug für die Visualisierung intrazellulärer Bakterienmembranen dar. Dies ermöglicht die Untersuchung von Pathogen-Wirt-Wechselwirkungen und fördert somit die Entwicklung von neuen Antibiotika mit verbesserter Membranpermeabilität.

In einem weiteren Projekt von Dr. Lena Kaiser und Dr. Simon Peters aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) wurde ω -Azidosphingosin (**47**) in Kombination mit Licht- und Elektronenmikroskopie für die Untersuchung des Wirkmechanismus von antibakteriellen Sphingolipiden gegen den mikrobiellen Erreger *Neisseria meningitidis* eingesetzt.^[411-413] Dieses gramnegative, extrazelluläre Bakterium, das auch als Meningokokkus bekannt ist, besiedelt asymptomatisch die Schleimhautoberfläche des Oropharynx von etwa 10 % der menschlichen Bevölkerung und wird durch Tröpfcheninfektion übertragen.^[414] Wenn die Bakterien das Schleimhautepithel durchqueren und in den Blutkreislauf gelangen, ist eine invasive Meningokokkenerkrankung (IMD) als Folge möglich. Diese kann zu einer lebensbedrohlichen Meningitis oder Sepsis führen, aber auch zu anderen Krankheiten wie Lungenentzündung und Arthritis.^[189,415] Selbst nach jahrzehntelangen Bemühungen für die Entwicklung wirksamer Impfstoffe, stellt die IMD mit weltweit jährlich ca. eine Million Fällen und einer Gesamtmortalität von 4–20 % nach wie vor eine große Herausforderung für die öffentliche Gesundheit dar.^[415,416] Die Suche nach neuen antimikrobiellen Substanzen wie Sphingolipide und deren Derivate sowie die Untersuchung der Wirkmechanismen gegen die Pathogene ist daher von großem medizinischem Interesse.

Zunächst wurde ω -Azidosphingosin (**47**) von den oben genannten Kooperationspartnern hinsichtlich einer möglichen bakteriziden Aktivität gegenüber *N. meningitidis* untersucht. Dafür wurde sowohl die minimale Hemmkonzentration (MIC) als auch die minimale bakterizide Konzentration (MBC) bestimmt. Der MIC-Wert, d. h. die niedrigste Konzentration an hemmender Substanz, bei der keine Trübung der Nährlösung durch die Vermehrung der Mikroorganismen mit bloßem Auge sichtbar ist, lag für das Azid **47** bei $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und entspricht somit dem Wert des natürlichen Sphingosins. Der MBC-Wert, d. h. die geringste Konzentration, bei der 99.9 % der Erreger abgetötet werden, lag für ω -N₃-Sphingosin (**47**) bei $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ und ist doppelt so hoch als der MBC-Wert des unmodifizierten Sphingosins **1** ($4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).^[189,411,412]

Um genauere Informationen über den Wirkmechanismus von Sphingosin bzw. des clickbaren Analogons **47** zu erhalten sowie morphologische Veränderungen der Bakterien zu erkennen, wurden die Neisserien von Dr. Lena Kaiser und Dr. Simon Peters mit unterschiedlichen Mengen an Azid **47** versetzt und anschließend mit einem Transmissions- (TEM) und einem Rasterelektronenmikroskop (SEM) untersucht (Abbildung 21). Insgesamt hatte die Behandlung von *Neisseria meningitidis* mit niedrigen Konzentrationen von **47** ($0.1 \times \text{MBC}$) nur eine geringfügige Veränderung der Oberfläche und Form der Bakterien zur Folge, während die minimale bakterizide Konzentration an **47** zu deutlichen morphologischen Veränderungen der Bakterien führte. $\omega\text{-N}_3\text{-Sphingosin}$ (**47**) induziert also eine konzentrationsabhängige Membranveränderung und -störung.^[411-413]

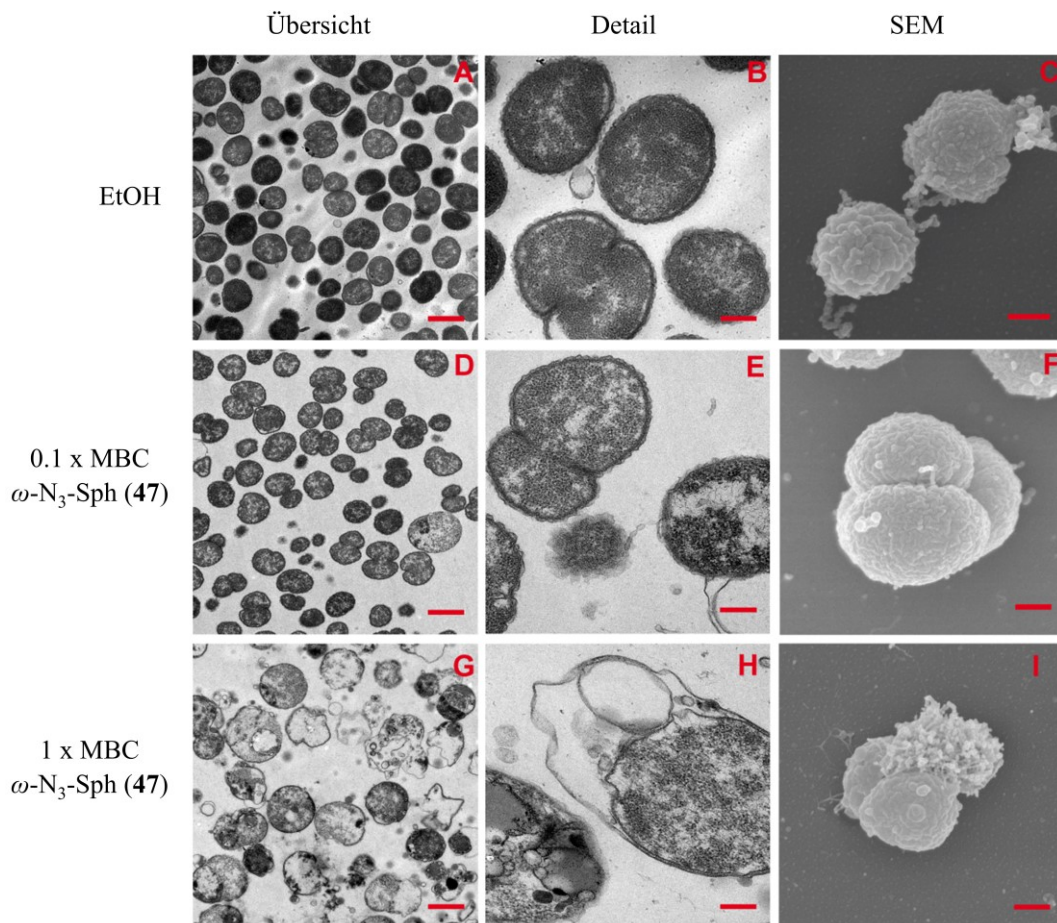


Abbildung 21: Repräsentative TEM-/SEM-Aufnahmen von *Neisseria meningitidis* nach der Behandlung mit Ethanol (A–C) oder mit $\omega\text{-N}_3\text{-Sphingosin}$ (**47**) mit einer Konzentration von $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 0.1 \times \text{MBC}$ (D–F) bzw. $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 1 \times \text{MBC}$ (G–I). Behandlung der Bakterien mit **47** führte zu Zellschäden und zum Verlust der Membranintegrität. 1. Spalte: TEM-Übersichtsaufnahmen (Maßstabsbalken: $1 \mu\text{m}$), 2. Spalte: TEM-Detailaufnahmen ($0.25 \mu\text{m}$), 3. Spalte: SEM-Detailaufnahmen ($0.25 \mu\text{m}$). Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Lena Kaiser und Dr. Simon Peters (AG Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bei *Scientific Reports* veröffentlicht.^[411]

Nachdem die TEM/SEM-Analyse die Visualisierung der morphologischen und ultrastrukturellen Veränderungen der Membran und der Zellwand ermöglichte, wurde die Sphingolipidverteilung von Kaiser *et al.* mit Hilfe eines Markierungsprotokolls auf subzellulärer Ebene verfolgt. Dazu wurde die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) eingesetzt, bei der ein Fluoreszenzbild der Probe mit einer SEM-Aufnahme derselben Stelle am Computer überlagert wird.^[417,418] Die von Dr. Lena Kaiser und Dr. Simon Peters durchgeführten Experimente demonstrierten, dass Bakterien, die mit 0.1 x MBC an ω -N₃-Sphingosin (**47**) behandelt worden sind, wie bereits zuvor beobachtet, mit kontinuierlichem intrazellulärem Gehalt größtenteils in ihrer Morphologie unverändert blieben. Einige Bakterien zeigten jedoch Dehnungen der äußeren Membran. Die CLEM-Bildgebung weist auf die Integration von **47** in diese Membranverlängerungen hin (Abbildung 22 A). Dagegen war das markierte ω -N₃-Sphingosin (**47**) nach Behandlung mit 1 x MBC akkumuliert im Bakterienzytosol sichtbar (Abbildung 22 B).^[411-413]

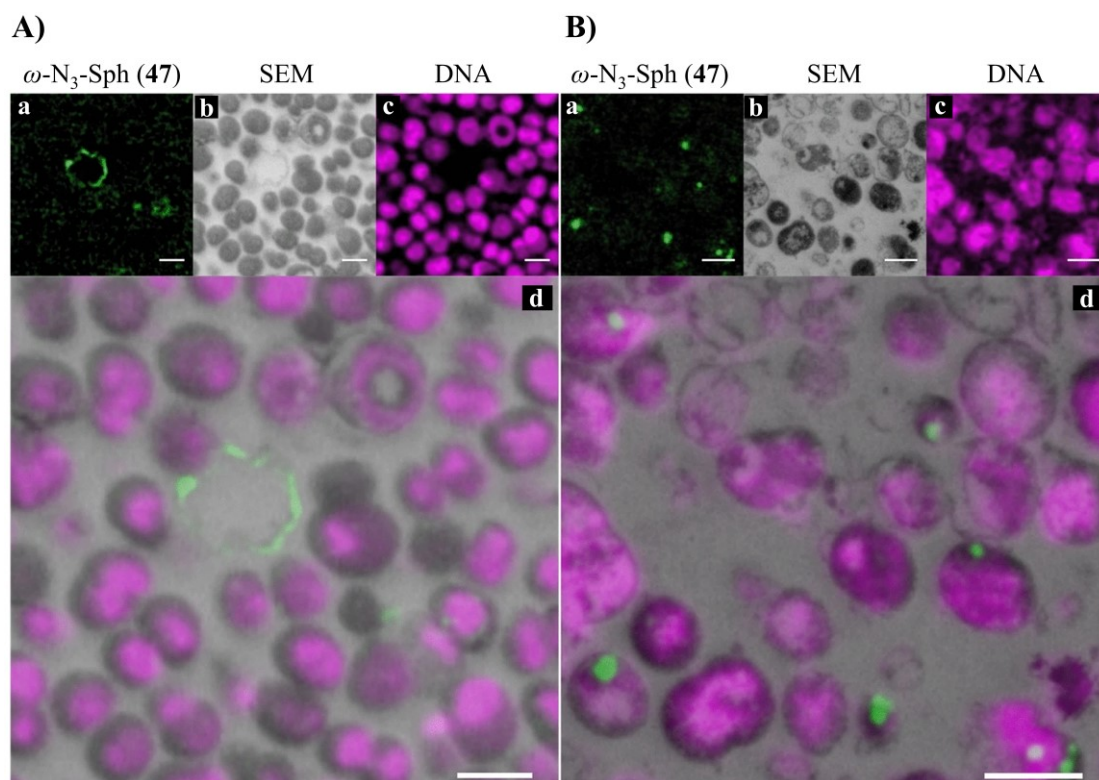


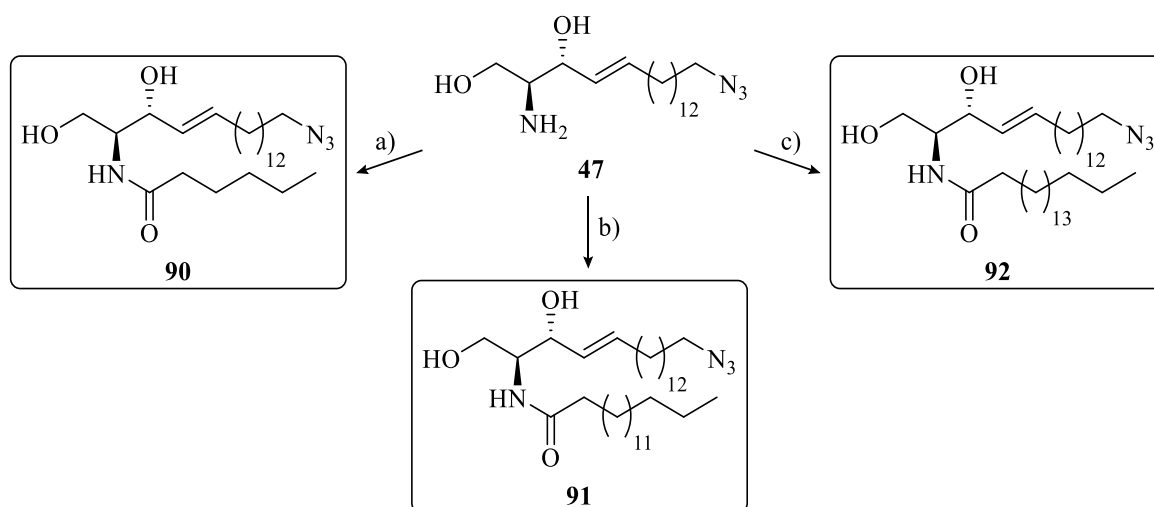
Abbildung 22: Repräsentative CLEM-Aufnahmen von *N. meningitidis* nach der Behandlung mit ω -N₃-Sphingosin (**47**) mit einer Konzentration von 0.1 x MBC (A) bzw. 1 x MBC (B). a, c) SIM-Einzelbilder der Signale von **47** (grün) und der DNA (magenta), b) SEM-Aufnahme der Bakterien (grau), d) finale Bilder nach der genauen, unverzerrten Überlagerung. Die Fluoreszenzmarkierung von **47** erfolgte durch Click-Reaktion mit DBCO-Alexa Fluor 488 (5 μ M, 37 °C, 15 min) und die der DNA mit Methylgrün. Maßstabsbalken: 1 μ m. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Lena Kaiser und Dr. Simon Peters (AG Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Scientific Reports* entnommen und modifiziert.^[411]

Aufgrund der im Vergleich zur Elektronenmikroskopie geringeren Auflösung der Fluoreszenzbildgebung wurden für genauere Aussagen zur Lokalisation des funktionalisierten Lipids zusätzlich von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Dazu wurden die innere und äußere Membran der Bakterien nach der Inkubation mit ω -N₃-Sphingosin (**47**) getrennt und die Menge an funktionalisiertem Lipid in den verschiedenen Membranfraktionen quantifiziert. Diese Untersuchung zeigte in der reinsten Fraktion der äußeren Membran eine stark erhöhte Menge an **47** im Vergleich zu den Fraktionen der inneren Membran und demonstriert somit den primären Effekt des Sphingosinderivats auf die äußere Membran der Bakterien.^[411]

Diese Ergebnisse liefern weitere Einblicke in den Wirkmechanismus von antibakteriellen Sphingolipiden, jedoch müssen noch Lipid-Protein-Wechselwirkungen oder die Ursache für die beobachtete Lipidakkumulation im Zytosol bei höheren Konzentrationen aufgeklärt werden.

4.1.3.5 Ceramide mit azidfunktionalisiertem Sphingolipidgrundgerüst

Das zuvor dargestellte ω -N₃-Sphingosin (**47**) diente fortführend als Ausgangssubstanz für kurz- und langkettige Ceramidderivate mit C₆- (**90**), C₁₆- (**91**) und C₁₈- (**92**) Fettsäureresten. Für die Synthese der ω -Azidoceramide wurde **47** jeweils mit der entsprechenden Carbonsäure umgesetzt, wobei HBTU oder ein EDC/HOBt-System als Kupplungsreagenz fungierte (Schema 23).



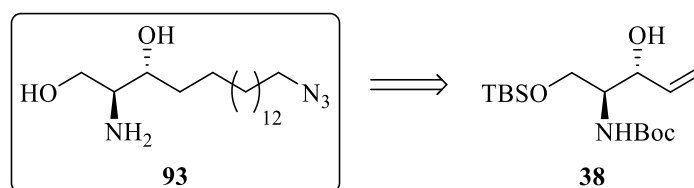
Schema 23: Durchgeführte Synthesen von Ceramidderivaten mit azidfunktionalisiertem Lipidgrundgerüst durch Amidkupplung von ω -N₃-Sphingosin (**47**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Hexansäure, EDC·HCl, HOBt·H₂O, DIPEA, DCM, 0 °C, 2 h, dann RT, 18 h, 78 %; b) Hexadecansäure, HBTU, DIPEA, DMF, 0 °C→RT, 2.5 h, 96 %; c) Octadecansäure, EDC·HCl, HOBt·H₂O, DIPEA, DCM, 0 °C, 2 h, dann RT, 18 h, 54 %.

Im Gegensatz zu den in Kapitel 4.1.3.1 gezeigten Ceramidderivaten, bei denen sich die Azidfunktion innerhalb des *N*-acylierten Fettsäurerestes befindet, kann die Click-Funktionalität bei den ω -N₃-Sphingosin-basierten Ceramiden **90**, **91** und **92** nicht durch Ceramidasen (CDasen) enzymatisch abgespalten werden. Dies gewährleistet eine stabile und permanente Markierung des Sphingolipidgrundgerüsts im biologischen System, während das ungewünschte Markieren von Fettsäuremetaboliten nach Umsetzung durch Ceramidasen verhindert wird.

Die Ceramide mit azidfunktionalisiertem Rückgrat sollen in weiterführenden Experimenten in Kooperation mit Forschungsgruppen des GRK 2581 für Zellfärbungen durch Click-Chemie und als Standardsubstanzen für MS-basierte Metabolismusassays zum Einsatz kommen. Zudem werden die Verbindungen auf ihre möglichen antibakteriellen Eigenschaften getestet und deren Grundlage anschließend mittels verschiedener Mikroskopietechniken wie SEM, TEM, CLEM (Kapitel 4.1.3.4) oder Fluoreszenzmikroskopie genauer untersucht.

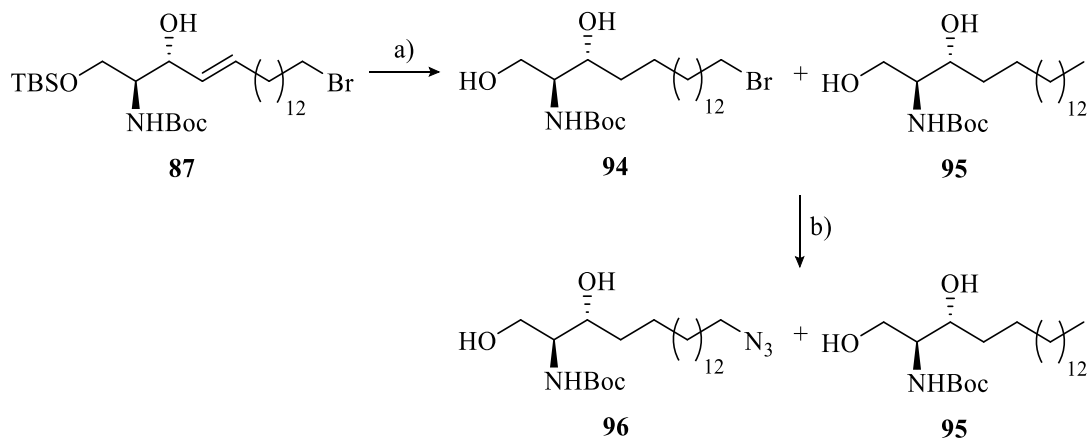
4.1.3.6 ω -Azidosphinganin

Die Vorteile der bioorthogonalen Click-Chemie und die Möglichkeit einer stabilen Markierung für massenspektrometrische Untersuchungen sollten in einem weiteren Projekt durch Einführung einer Azidfunktion auf den Sphingolipidmetaboliten Sphinganin angewendet werden. Die Azidmodifikation sollte dabei am hydrophoben Ende des C₁₈-Sphingolipidgrundgerüsts lokalisiert sein, um natürliche enzymatische Vorgänge am polaren Kopfmotiv zu gewährleisten (Schema 24). Ein ω -N₃-modifiziertes Sphinganinderivat mit C₁₄-Rückgrat wurde 2015 von Garrido *et al.* dargestellt. Hierbei wurde zum Aufbau des Lipidgerüsts und zur Einführung des zweiten stereogenen Zentrums (*S*)-Garner-Aldehyd mit einem Lithiumorganyl und Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPA) versetzt.^[34] Im Gegensatz dazu sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein, in Eukaryoten häufiger vorkommendes, längeres C₁₈-Sphingolipidgerüst über einen Olefinkreuzmetathese-Schlüsselschritt ausgehend von Allylalkohol **38** und ohne Verwendung des stark kanzerogenen HMPA dargestellt werden (Schema 24).



Schema 24: Molekülstrukturen der Zielverbindung ω -Azidosphinganin (**93**) und der Ausgangssubstanz **38**.

Im ersten Versuch wurde Bromid **87**, welches eine Zwischenstufe bei der zuvor durchgeführten Synthese von ω -N₃-Sphingosin (**47**) darstellt (Kapitel 4.1.3.4), mit elementarem Wasserstoff und Palladiumkatalysator auf Kohle reduziert (Schema 25). Ziel dabei war, dass sowohl das C₁₈-Grundgerüst durch Hydrierung gesättigt als auch die Silylschutzgruppe unter Freisetzung der primären OH-Funktion entfernt wird. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel wurde ein Gemisch aus der gewünschten bromierten Verbindung **94** (51 %) und des nicht-bromierten Nebenprodukts **95** (17 %) erhalten, welches durch einen Br-H-Austausch entstand. Die eindeutige Identifizierung von *N*-Boc-Sphinganin (**95**) erfolgte durch Aufnahme eines ESI⁺-Massenspektrums. Da beide Substanzen einen identischen R_F-Wert besitzen, war eine Trennung mittels Säulenchromatographie nicht möglich. Auch nachdem das Gemisch zur Substitution des Bromids mit Natriumazid versetzt wurde, konnten keine R_F-Wertunterschiede zwischen dem generierten Azid **96** und **95** festgestellt werden. Die Zusammensetzungen der nicht trennbaren Gemische aus **94** und **95** bzw. **96** und **95** wurden jeweils mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.



Schema 25: Durchgeführte Vorversuche zur Synthese von ω -Azidosphinganin (**93**), bei welcher das gesättigte Lipidrückgrat über eine Hydrierungsreaktion des Bromids **87** aufgebaut werden sollte. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H₂, Pd/C, EtOAc/EtOH, 6 h, (51 % **94**, 17 % **95**); b) NaN₃, DMF, 70 °C, 16 h.

Um eine Insertion des Palladiums in die C-Br-Bindung (oxidative Addition) zu verhindern, wurde das langkettige Bromid **86** vor der Olefinkreuzmetathesereaktion zunächst durch eine Williamson-Synthese zu Benzylether **98** umgesetzt (Schema 26). Der gebildete Ether sollte bei der anschließend geplanten Reduktion des C₁₈-Lipidgrundgerüsts mit Wasserstoff gleichzeitig eine Hydroxygruppe in ω -Position freisetzen, welche daraufhin weiter zum gewünschten Azid umfunktionalisiert werden kann. Die Ethersynthese wurde mit *in situ* erzeugtem Benzylalkoholat in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) durchgeführt, wobei Alken **98** mit einer Ausbeute

von 68 % erhalten wurde. Die Ruthenium-katalysierte Olefinkeuzmetathese zwischen **98** und Allylalkohol **38** in Dichlormethan lieferte die *E*-konfigurierte Verbindung **99** mit einer Ausbeute von 55 %. Durch Zugabe von TBAF-Lösung wurde die *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe sehr effizient abgespalten (97 %). Beide Hydroxygruppen des entstandenen Diols **100** wurden daraufhin mit Essigsäureanhydrid in Pyridin quantitativ acetyliert, sodass das vollständig geschützte Sphingolipidderivat **101** erhalten wurde (Schema 26).

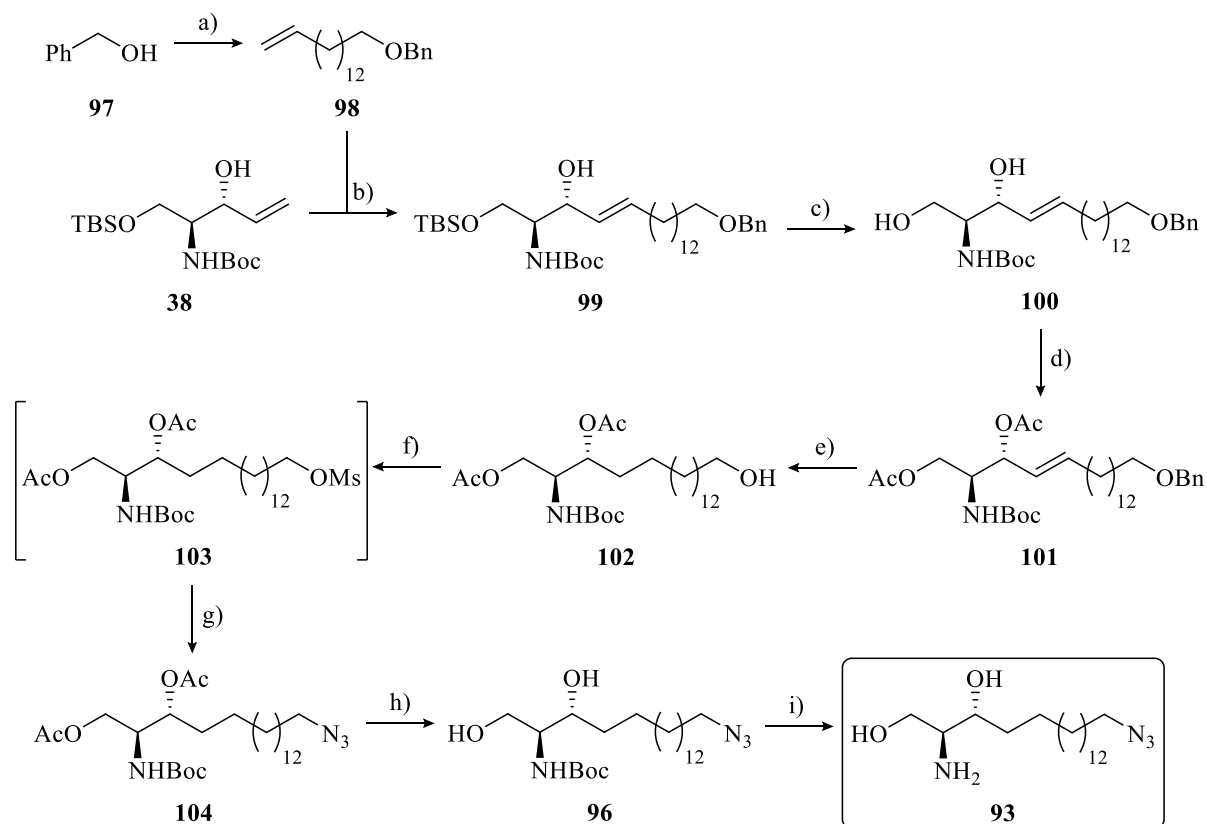
Die Reduktion der C-C-Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 sowie die selektive Abspaltung der orthogonalen Benzylschutzgruppe unter Erhalt der Acetylgruppen wurden in einem Schritt mittels Wasserstoffgas durchgeführt. Dazu wurde eine Lösung aus Verbindung **101** in Ethanol und Ethylacetat im Ultraschallbad für zehn Minuten entgast, mit 5 Mol-% Palladiumkatalysator auf Aktivkohle versetzt und unter H₂-Atmosphäre zwei Tage kräftig gerührt. Zur Reinigung wurde das Gemisch über Kieselgel filtriert, mit Ethylacetat eluiert und das Lösungsmittel des Filtrats destillativ entfernt. Der gesättigte Alkohol **102** wurde in quantitativer Ausbeute isoliert.

Nachdem die terminale Hydroxygruppe frei vorlag, wurde diese in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt. Die Mesylierung erfolgte mit Methansulfonsäurechlorid (MsCl) unter basischen und wasserfreien Bedingungen, wobei *N,N*-Dimethylpyridin-4-amin (DMAP) als nukleophiler Katalysator zugesetzt wurde. Zur Deaktivierung von restlichem MsCl und zur Entfernung des gebildeten Triethylammoniumchlorids wurde wässrig aufgearbeitet. Um eine Rückreaktion durch Hydrolyse zu vermeiden, wurde die Extraktion mit Dichlormethan zügig durchgeführt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das erhaltene Mesylrohprodukt **103** ohne weitere Reinigung und Charakterisierung direkt zu Azid **104** umgesetzt. Die S_N2-Reaktion erfolgte mit einem Überschuss an Natriumazid in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) als polar-aprotisches Lösungsmittel bei 60 °C über Nacht. Das dreifach geschützte azidfunktionalisierte Sphinganin-derivat **104** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung mit 84 % Ausbeute über zwei Stufen isoliert (Schema 26).

Die anschließende selektive Abspaltung der Acetylschutzgruppen erfolgte durch Umesterung unter Zemplén-Bedingungen mit katalytischen Mengen an Natriummethanolat in trockenem Methanol. Es handelt sich hierbei um eine sehr effiziente Methode der Deacetylierung unter milden Reaktionsbedingungen.^[419,420] Zudem kann das Produkt durch Neutralisation des gebildeten Alkoholats mit einem sauren Ionentauscher und anschließendem Entfernen des Lösungsmittels einfach isoliert werden. Eine weitere Reinigung ist allgemein nicht nötig, da das einzige Nebenprodukt Essigsäuremethylester destillativ leicht zu entfernen ist. Diol **96** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten (Schema 26).

Die finale Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde in Anlehnung an Garrido *et al.* mittels *in situ*-HCl-Generierung durchgeführt.^[34] Dazu wurde Carbamat **96** in methanolischer Lösung unter Eisbadkühlung mit 12 Vol.-% Acetylchlorid versetzt und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Nach wässrig-basischer Aufarbeitung und der Extraktion mit Dichlormethan wurde das gewünschte ω -N₃-Sphinganin (**93**) mit einer Ausbeute von 66 % erhalten (Schema 26). Erwähnenswert ist, dass es laut DC-Kontrollen hierbei zu keinen anderen Nebenreaktionen kam, da im Gegensatz zum ungesättigten Sphingosingerüst kein Allylalkoholmotiv in der Molekülstruktur von Carbamat **96** vorhanden ist (Kapitel 4.1.2). Allgemeine Vorteile bei der *in situ*-HCl-Generierung durch Acetylchlorid in Methanol sind die milden Reaktionsbedingungen und die Möglichkeit, die Stöchiometrie genau zu definieren.^[421]

Die erfolgreich abgeschlossene Syntheseroute zu ω -Azidosphinganin (**93**) wurde in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht und ist in Schema 26 dargestellt.^[422]



Schema 26: Durchgeführte Synthese von ω -Azidosphinganin (**93**) ausgehend von Allylalkohol **38** und dem olefinischen Benzylether **98**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) NaH, DMF, 0 °C, 1.5 h, dann 15-Brompentadecen (**86**), 0 °C, 1 h, dann RT, 19 h, 68 %; b) Grubbs II-Kat., DCM, 50 °C, 3.5 h, 55 %; c) TBAF, THF, 0 °C→RT, 30 min, 97 %; d) Ac₂O, Pyridin, 0 °C→RT, 24 h, quant.; e) H₂, Pd/C, EtOH/EtOAc, RT, 2 d, quant.; f) MsCl, DMAP, NEt₃, DCM, 0 °C→RT, 30 min; g) NaN₃, DMF, 60 °C, 18 h, 84 % (2 Stufen); h) NaOMe, MeOH, RT, 30 min, quant.; i) AcCl, MeOH, 0 °C→RT, 1.5 h, 66 %.

Die ^1H -, ^{13}C -NMR- sowie die (^1H , ^{15}N)-HMBC-Spektren bestätigen die erfolgreiche Synthese von **93**. Im ^1H -NMR-Spektrum erscheint das Proton am stereogenen Kohlenstoffatom C-2 als Dublett von Dubletts von Dubletts (Abbildung 23). Dieses Aufspaltungsmuster beruht auf den Kopplungen zu den beiden diastereotopen Protonen $H-1_a$ und $H-1_b$ sowie dem Proton $H-3$ über je drei Bindungen. Diese Kopplungen gehen mit den Konstanten $^3J_{2,1a} = 7.6 \text{ Hz}$, $^3J_{2,3} = 5.3 \text{ Hz}$ und $^3J_{2,1b} = 4.2 \text{ Hz}$ ein. Die beiden Protonen an C-1 erscheinen aufgrund geminaler Kopplung untereinander ($^2J_{1a,1b} = 10.9 \text{ Hz}$) und vicinaler Kopplung zu $H-2$ jeweils als ein Dublett von Dubletts bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen (3.47 ppm und 3.73 ppm). Das Multiplettsignal bei 3.49–3.52 ppm ist dem Proton $H-3$ am (*R*)-konfigurierten Kohlenstoffatom zuzuordnen. Die Protonen der azidgebundenen CH_2 -Gruppe ($H-18$) resonieren bei 3.28 ppm als Triplet mit einer Kopplungskonstanten von $^3J_{18,17} = 6.9 \text{ Hz}$. Die benachbarte Methylen-einheit zeigt für deren Protonen ($H-17$) zusammen mit den zwei Protonen $H-4_b$ und $H-5_b$ ein Multiplettsignal zwischen 1.54 und 1.61 ppm mit einem Integralwert von 4. Die restlichen 24 Protonen ($H-4_a$, $H-5_a$ und $H-6$ – 16) ergeben ein Multiplettsignal im aliphatischen Bereich zwischen 1.30 und 1.44 ppm und können somit nicht exakt den einzelnen CH_2 -Ketteneinheiten zugeordnet werden. Aufgrund intermolekularer Austauschprozesse mit dem deuterierten Lösungsmittel CD_3OD werden für die Amin- und Hydroxyprotonen keine Signale erhalten (Abbildung 23).

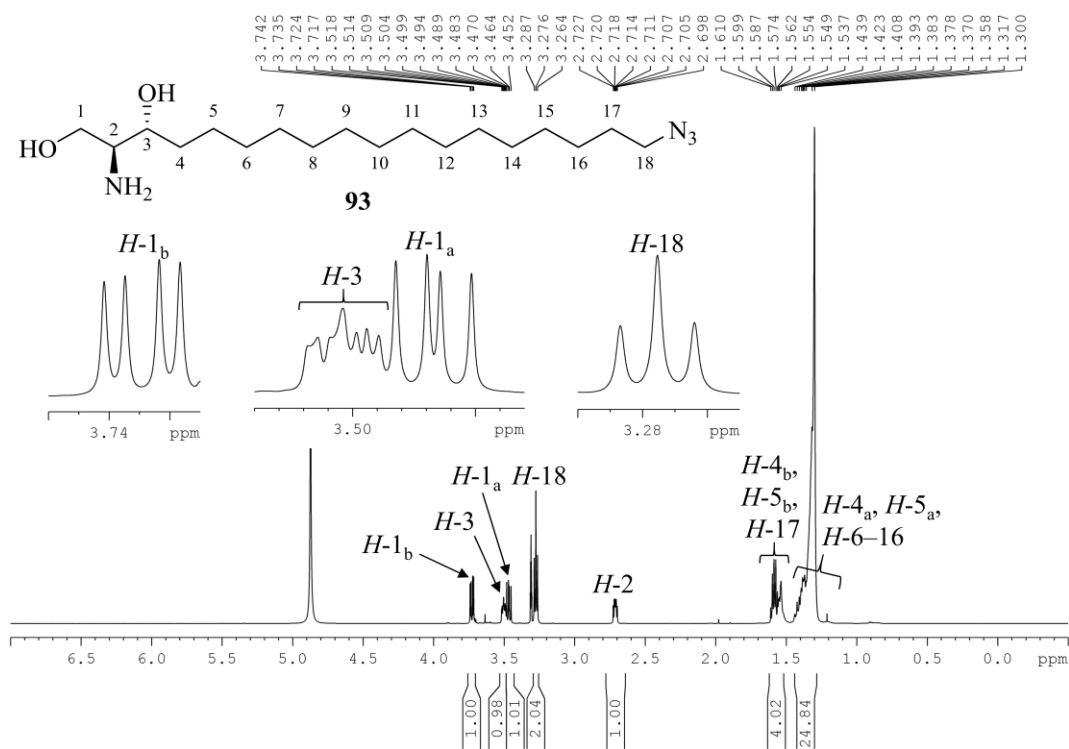
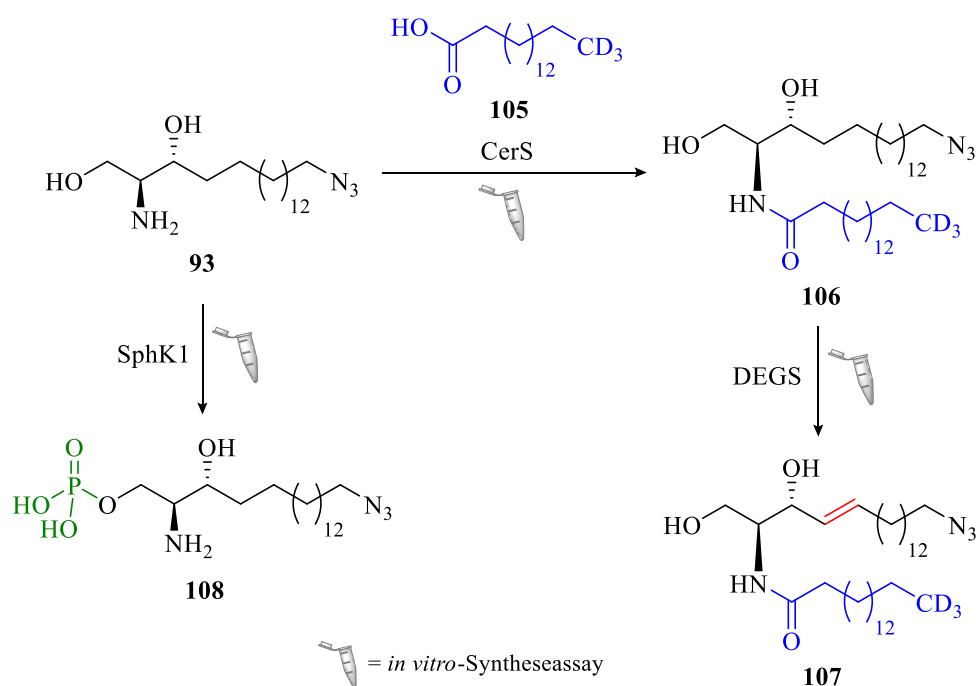


Abbildung 23: Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von **93** (CD_3OD , 600 MHz).

Die massenspektrometrische Untersuchung mittels ESI bestätigt ebenfalls die erfolgreiche Darstellung von ω -N₃-Sphinganin (**93**). Das [M+H]⁺-Signal ist bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 343.30675 (berechnet: m/z 343.30675) zu beobachten.

Das azidmodifizierte Sphinganinanalogue **93** wurde daraufhin von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) zur Untersuchung einzelner Metabolisierungsschritte eingesetzt, welche im Rahmen eines mikrosomalen *in vitro*-Assays durchgeführt und in Kombination mit Flüssigchromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert wurden. Die im Interessensfokus stehenden Biosynthesewege ausgehend von Lipidderivat **93** sind im nachfolgenden Schema 27 gezeigt.



Schema 27: Einzelne Metabolisierungsschritte ausgehend von ω -N₃-Sphinganin (**93**), welche im Rahmen eines zellfreien, mikrosomalen Assays durchgeführt werden sollten. Für eine massenspektrometrische Analyse der *de novo*-Sphingolipidsynthese, hier die Bildung von Dihydroceramid **106** und Ceramid **107**, wurde 16,16,16-d₃-Palmitinsäure (**105**) (Pal-d₃) als isotopenmarkiertes Substrat eingesetzt. Zusätzlich zur ER-basierten *de novo*-Synthese sollte durch Zugabe von SphK1 eine mögliche Phosphorylierung zu ω -N₃-Sphinganin-1-phosphat (**108**) untersucht werden.

Zu Beginn wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser untersucht, ob ω -Azido-sphinganin (**93**) von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums (ER), die bei der *de novo*-Sphingolipidsynthese beteiligt sind, als Substrat akzeptiert wird.

Das erste potenzielle ER-basierte Biosyntheseprodukt stellt das azidmarkierte und deuterierte C_{16} -Dihydroceramid **106** dar, dessen Bildung durch Ceramidsynthasen (CerS) im Mikrosomenassay katalysiert wird (Schema 27). Diese metabolische Sphingolipidzwischenstufe wurde von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger sowohl durch die genauen Masse-zu-Ladungsverhältnisse der detektierten Molekülonen als auch durch zwei charakteristische MS/MS-Fragmentierungen eindeutig identifiziert (Abbildung 24).

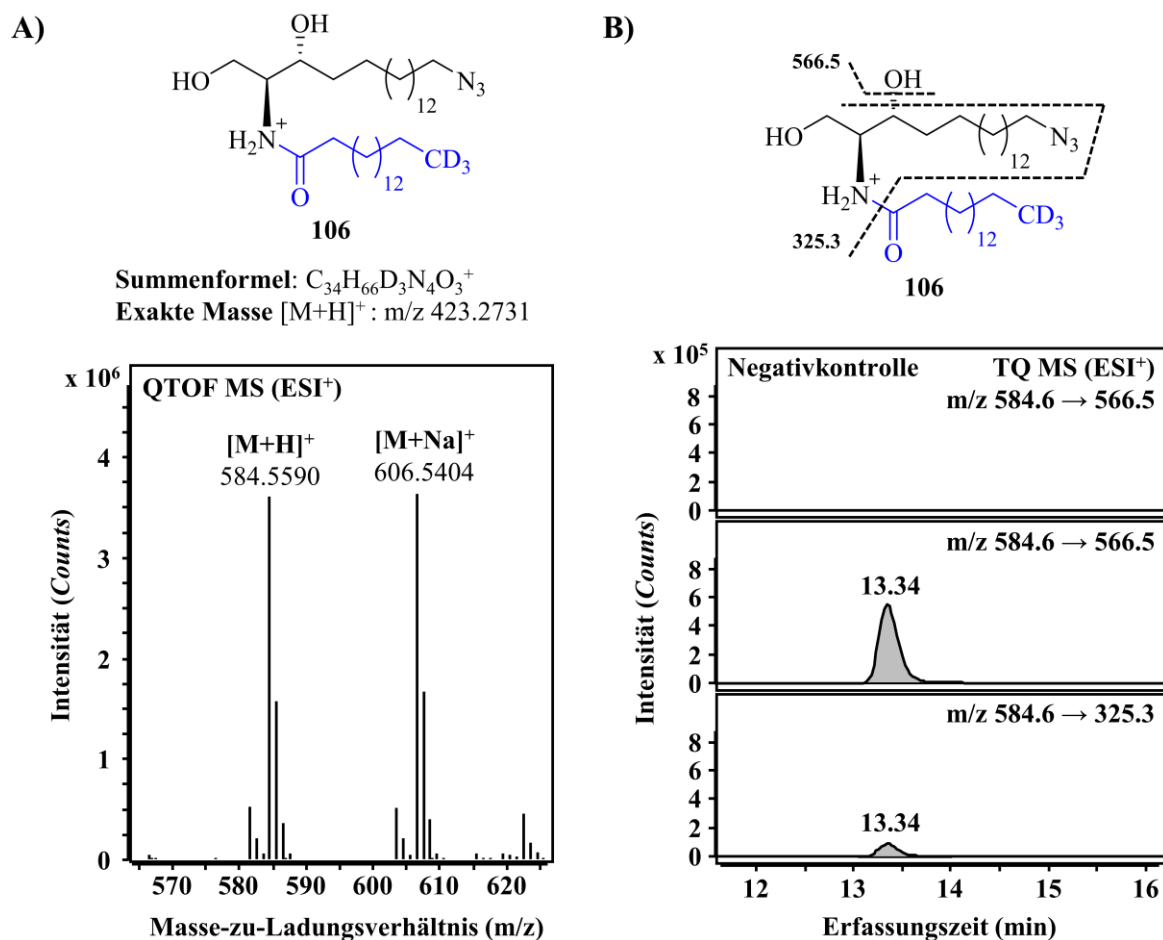


Abbildung 24: Massenspektrometrische Detektion des ersten möglichen *in vitro*-Metabolisierungsprodukts **106** ausgehend von ω - N_3 -Sphingarin (**93**). Eindeutige Identifizierung des deuterierten, azidmodifizierten Dihydroceramids **106** durch A) genaue m/z -Messwerte der Protonen- und Natriumaddukte und B) charakteristische MS/MS-Fragmentierungen. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung hinsichtlich des finalen *de novo*-Syntheseprodukts Ceramid **107**, dessen Bildung ausgehend von **106** durch Dihydroceramidessaturase (DEGS) katalysiert wird (Schema 27). Die von den Kooperationspartnern durchgeführte MS-Analyse bestätigte die erfolgreiche *in vitro*-Synthese von C₁₆-Ceramid **107** (Abbildung 25).

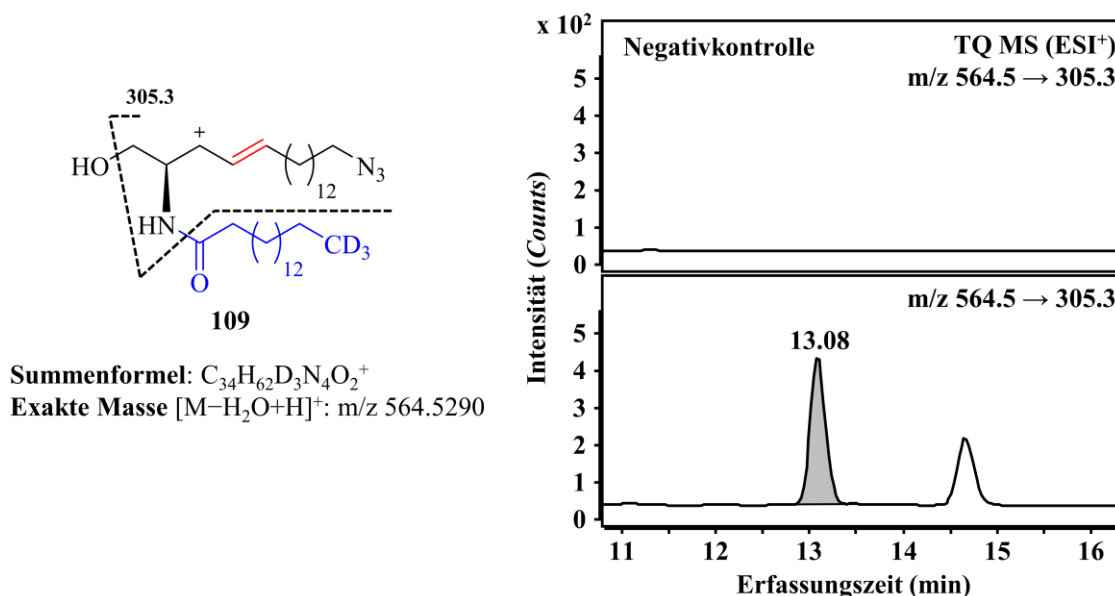


Abbildung 25: Massenspektrometrische Detektion des deuterierten und azidmodifizierten Ceramids **107** als finales *de novo*-Syntheseprodukt durch eine, für Ceramide charakteristische, MS/MS-Fragmentierung der kationischen Spezies **109**. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

Nachdem die Akzeptanz und Umsetzung von ω -N₃-Sphingalin (**93**) als Substrat von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums demonstriert wurde, erfolgte zusätzlich die Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung durch Sphingosinkinase 1 (SphK1) zu ω -N₃-Sphingalin-1-phosphat (**108**) (Schema 27). Dazu wurde von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger beim mikrosomalen Assay vor der Inkubation noch humane SphK1 zugegeben. Das erwartete phosphorylierte Stoffwechselprodukt **108** wurde schließlich massenspektrometrisch eindeutig identifiziert. Die von den Kooperationspartnern detektierte charakteristische Fragmentierung bestätigte zusätzlich die *in vitro*-Synthese des phosphorylierten Metaboliten **108** durch SphK1 (Abbildung 26).

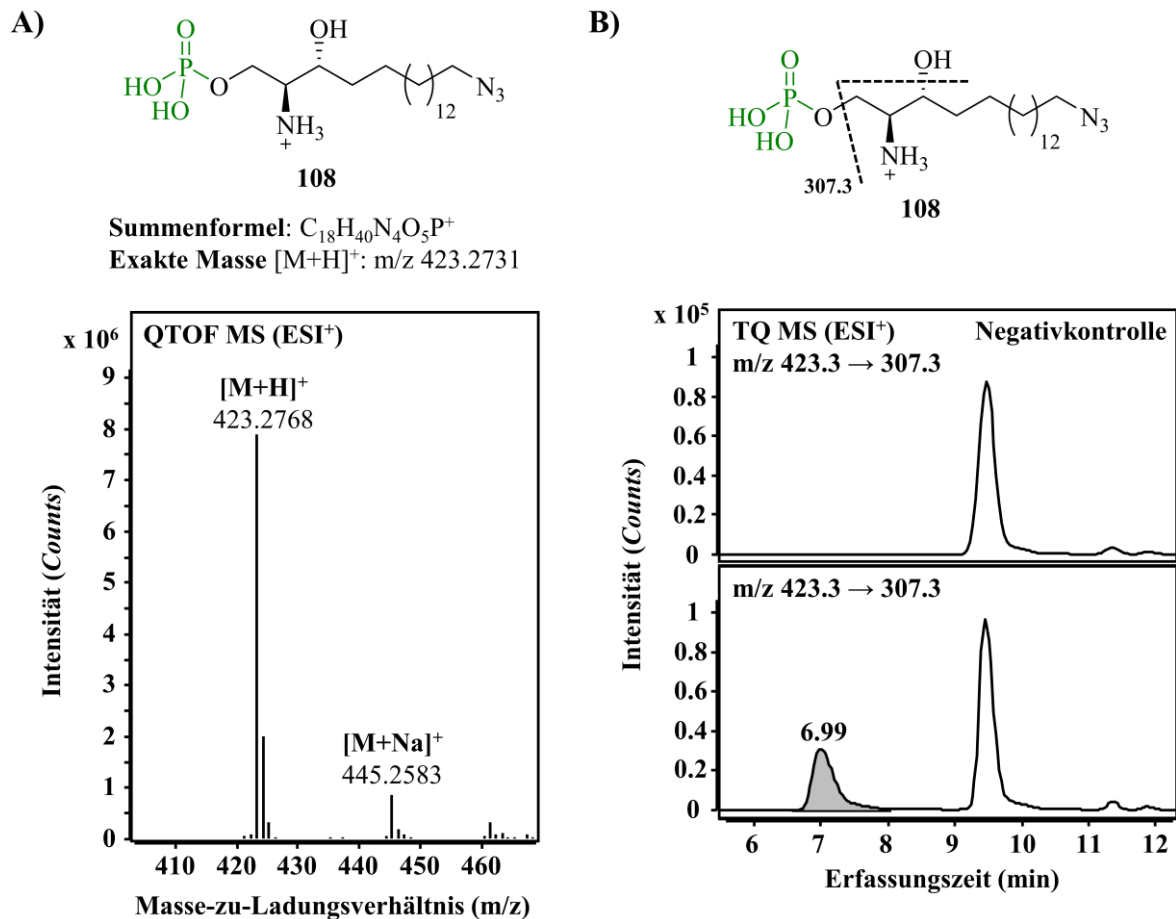


Abbildung 26: Massenspektrometrische Detektion des Phosphorylierungsprodukts von ω -N₃-Sphingarin (**93**) nach *in vitro*-Metabolisierung mit SphK1. Eindeutige Identifizierung von ω -N₃-Sphingarin-1-phosphat (**108**) durch A) genaue m/z -Messwerte der Protonen- und Natriumaddukte und B) charakteristische MS/MS-Fragmentierung. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

Insgesamt eignet sich das maßgeschneiderte Sphinganderivat **93** aufgrund der stabilen und kleinen Azidmodifikation in ω -Position und der damit verbundenen enzymatischen Akzeptanz als wirksames Werkzeug für die Nachahmung einzelner Sphingolipidmetabolismusschritte.

Um die Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung von Sphingolipidstoffwechsel-basierten Krankheiten zu ermöglichen, ist die zellbiologische Untersuchung von Sphingarin als Vorstufe komplexer Sphingolipide in lebenden Systemen unabdingbar. Deshalb wurde das Sphingarin-analogon **93** kombiniert mit dem DBCO-Farbstoff **110** von Dr. Jan Schlegel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) für kupferfreie SPAAC-Markierungsexperimente in lebenden humanen Osteosarcoma-Epithel (U2OS)- und COS7-Zellen eingesetzt.

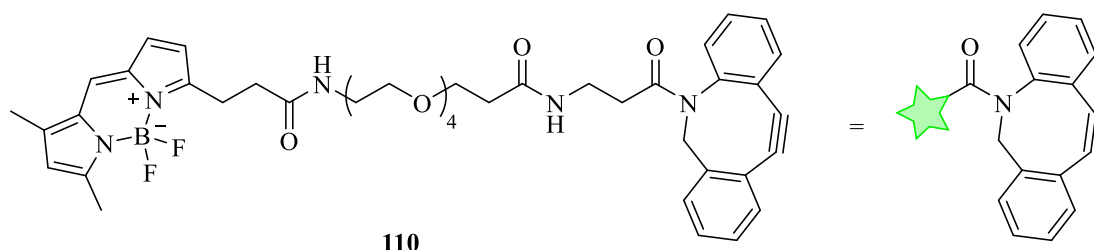


Abbildung 27: Strukturformel des eingesetzten DBCO-funktionalisierten BODIPY-Fluorophors **110** und dessen vereinfachte Darstellung (rechts).

Die Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Sauer ergaben, dass das azid-funktionalisierte Sphinganinderivat **93** schnell von den lebenden U2OS-Zellen aufgenommen wurde und die Konjugation mit dem zellmembranpermeablen Fluorophor **110** eine effiziente Visualisierung des Lipids bei hohem Signal-Rausch-Verhältnis ermöglichte. Wie für nicht-modifiziertes endogenes Sphingarin erwartet, war das clickbare Analogon hauptsächlich in Tubuli des endoplasmatischen Retikulums, dem *de novo*-Sphingolipidsyntheseort, und in der Zellkernmembran lokalisiert (Abbildung 28).

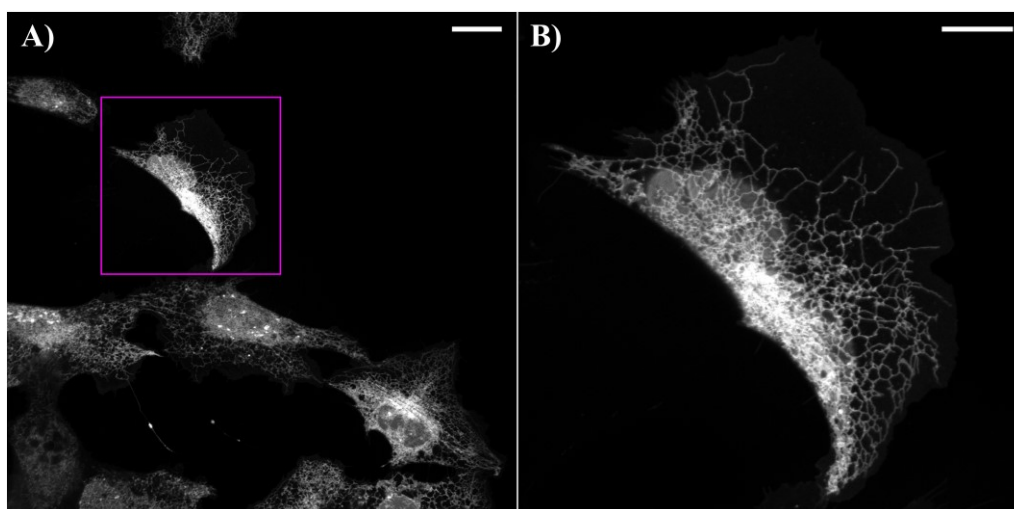


Abbildung 28: A) Bildgebung von ω -Azidosphingarin (**93**) in lebenden humanen Osteosarcoma-Epithelzellen (U2OS) mittels bioorthogonaler Click-Reaktion und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. U2OS-Zellen wurden mit **93** ($1\ \mu\text{M}$) inkubiert und mit dem membranpermeablen DBCO-BODIPY **110** ($1\ \mu\text{M}$) markiert. B) Vergrößerung des lila Ausschnitts zeigt eine effektive Inkorporation des ω -N₃-Sphingans **93** in ER-Tubuli und in die Kernmembran. Maßstabsbalken: $20\ \mu\text{m}$ (A), $10\ \mu\text{m}$ (B). Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Jan Schlegel (AG Prof. Dr. Markus Sauer, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

Im Anschluss wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Schlegel Zweifarbenexperimente durchgeführt, bei denen lebende COS7-Zellen vor der Inkubation mit ω -N₃-Sphingarin (**93**) mit einer fluoreszierenden Version des ER-spezifischen Proteins Sec61B transfiziert wurden.^[423]

Die Zweifarben-Lebendzellaufnahmen zeigten in den transfizierten COS7-Zellen eine starke Colokalisation des ER-Markers und des konjugierten Sphingarinderivats, insbesondere in Tubuli des endoplasmatischen Retikulums (Abbildung 29). Bemerkenswerterweise wurden auch homogene Strukturen zwischen einigen Tubuli, die ER-*Sheets* (blattähnliche Zisternen) darstellen könnten, von Sphingarinanalogon **93** markiert. Umlagerungen des komplexen ER-Netzwerks konnten über längere Zeit verfolgt werden. Da die Markierungseffizienz und das Signal von **93** in allen getesteten Zelllinien sehr robust war und die zelluläre Lebensfähigkeit nicht beeinflusst wurde, handelt es sich hierbei um ein neues molekulares Werkzeug zur effizienten Markierung der ER-Membran durch bioorthogonale und kupferfreie Click-Reaktion in lebenden Zellen.

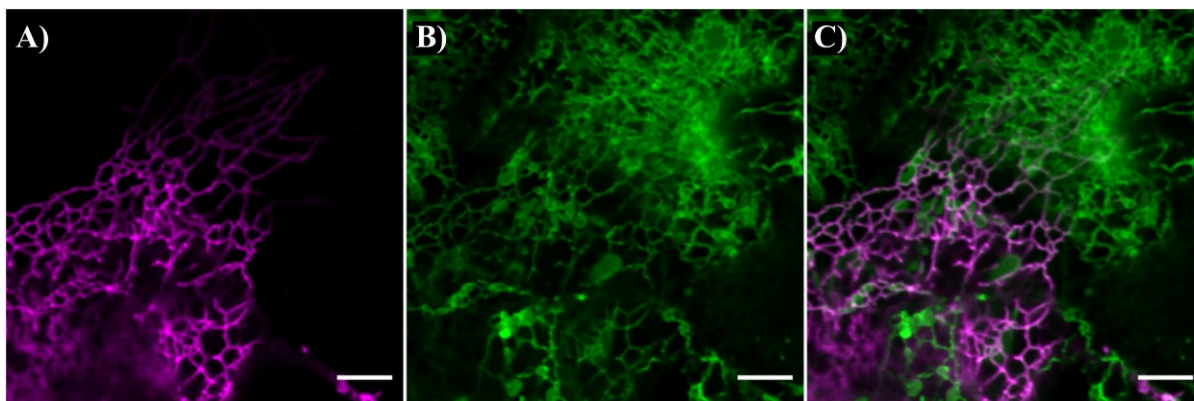
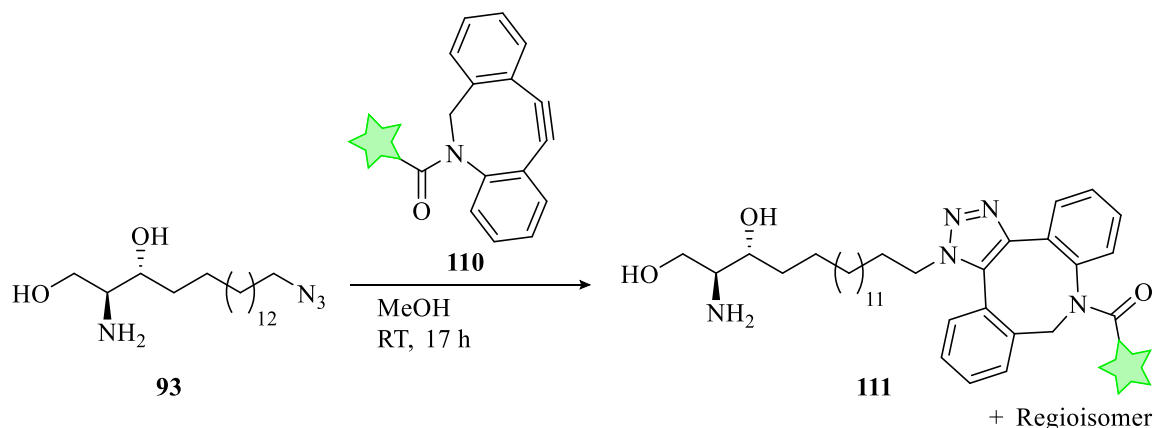


Abbildung 29: Zweifarben-Lebendzellaufnahmen (konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie) von COS7-Zellen, welche zunächst mit Sec61B-mApple transfiziert und dann mit 1 μ M ω -N₃-Sphingarin (**93**) inkubiert wurden. A) Sec61B-mApple-Bildgebung. B) Bildgebung durch bioorthogonale Click-Reaktion mit DBCO-BODIPY **110** (2 μ M), wobei hier zusätzlich homogene Strukturen zwischen Tubuli des endoplasmatischen Retikulums angefärbt wurden (möglicherweise ER-*Sheets*). C) Das Übereinanderlegen der Bilder zeigt eine gute Colokalisation in den ER-Tubuli. Maßstabsbalken: 5 μ m. Die Experimente und Datenauswertung wurden mit Dr. Jan Schlegel (AG Prof. Dr. Markus Sauer, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

Das azidfunktionalisierte Sphingarinanalogon **93** bietet den großen Vorteil, komplementäre Farbstoffe in nur einem Schritt durch Click-Reaktion an das Sphingolipidgerüst zu binden. Im Gegensatz zu vollständig synthetisierten Fluorophorlipidderivaten, bei denen der fluorophore Rest in einem frühen Stadium einer mehrstufigen Synthese eingeführt werden muss, bietet **93**

mehr Flexibilität und ermöglicht die Verwendung verschiedener Alkinfarbstoffe. Diese können unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Membrandurchgängigkeit oder der Wellenlängen von Absorptions- und Emissionsmaxima besitzen und somit je nach biologischer Fragestellung gezielt eingesetzt werden.

Nachdem massenspektrometrisch gezeigt wurde, dass **93** analog zu endogenem Sphinganin *in vitro* durch Sphingolipid-metabolisierende Enzyme effizient umgewandelt wird, stellte sich die Frage, ob dies auch nach Konjugation mit dem sperrigen Fluorophor **110** möglich ist. Zu diesem Zweck wurde Azid **93** in Methanol zunächst mit DBCO-BODIPY **110** versetzt, über Nacht bei 20 °C unter Lichtausschluss geschüttelt und anschließend vom Lösungsmittel befreit (Schema 28). Um die vollständige Umsetzung zum Click-Konjugat **111** zu erreichen, wurde Cyclooctin **110** in einem Überschuss von 1.50 Äquivalenten eingesetzt. Das erhaltene Triazol-rohprodukt diente daraufhin als Substrat für den zellfreien mikrosomalen *in vitro*-Assay zur Untersuchung der Akzeptanz von Sphingolipid-metabolisierenden Enzymen.



Schema 28: Durchgeführte Synthese des Click-Konjugats **111** aus ω -Azidosphinganine (**93**) und DBCO-PEG₄-BODIPY **110**, welches anschließend als Rohprodukt im *in vitro*-Metabolismusassay eingesetzt wurde.

Zu Beginn wurde die erfolgreiche Umsetzung beider Click-Reaktanden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger mit hochauflösender QTOF-Massenspektrometrie bestätigt. Im Rohprodukt wurde, neben BODIPY-Sphinganine **111** und Reste des im Überschuss eingesetzten DBCO-BODIPYs **110**, kein ω -Azidosphinganine (**93**) mehr detektiert. BODIPY-Sphinganine **111** konnte durch die beiden Molekülonen $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ eindeutig identifiziert werden. Nachdem die Identität des Click-Konjugats bestätigt wurde, fand dieses in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser als Substrat im *in vitro*-Metabolismusassay Anwendung.

Im Falle einer erfolgreichen Umsetzung von BODIPY-Sphingarin **111** mit Pal-d₃ (**105**) durch Ceramidsynthasen (CerS) ist ein fluorophormarkiertes und deuteriertes C₁₆-Dihydroceramid das erste zu erwartende vorläuferdirigierte Biosyntheseprodukt (Abbildung 30 A). Die Proben wurden daher von den Kooperationspartnern mittels hochauflösender QTOF-MS auf ein entsprechendes Masse-zu-Ladungsverhältnis von 1381.9324 untersucht. Dieses wurde bei einer Retentionszeit von 24.32 Minuten detektiert. Das Signal, das d₃-C₁₆-Dihydroceramid-BODIPY **112** zuzuordnen ist, fehlte in Abwesenheit von **111** in der Negativkontrolle und wurde in Gegenwart des CerS-Inhibitors FB₁ stark abgeschwächt (Abbildung 30 B).

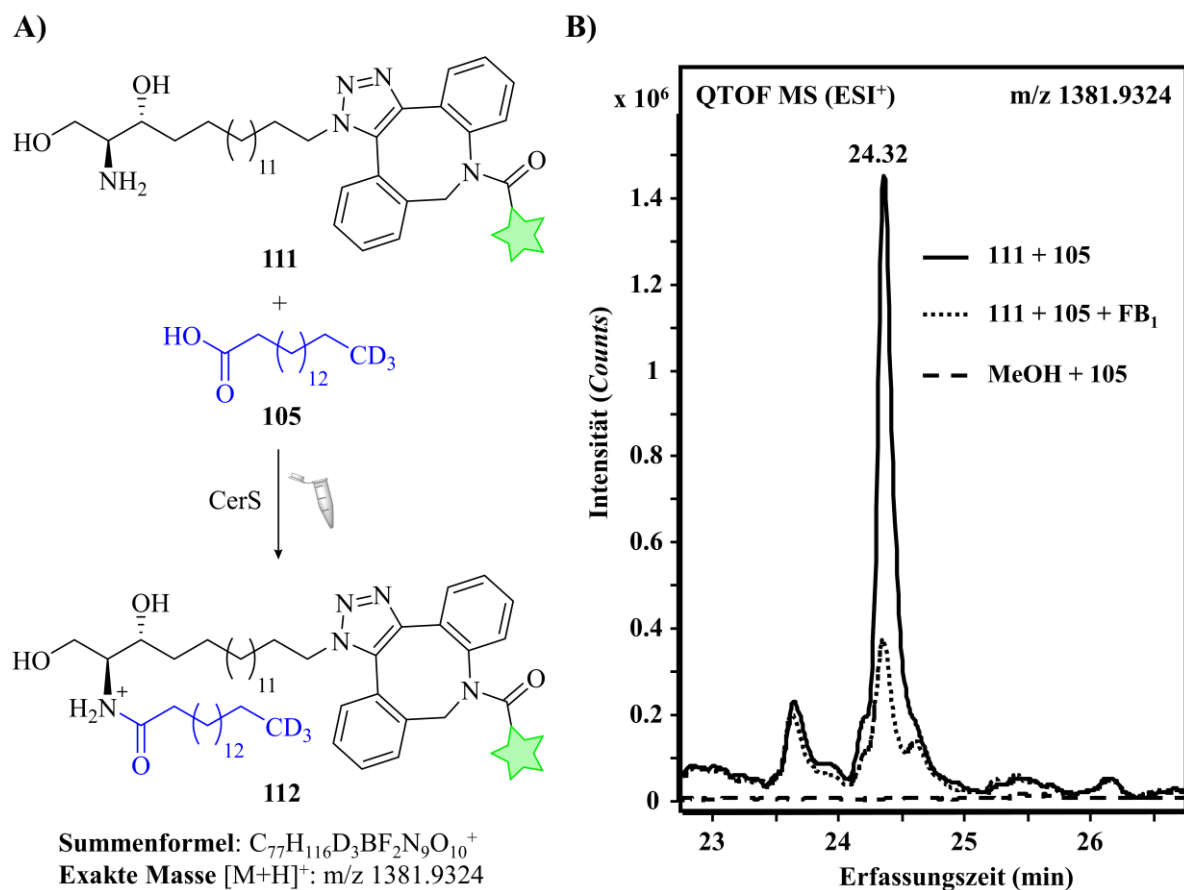


Abbildung 30: A) Mikrosomale Metabolisierung des Sphingarin-BODIPY-Konjugats **111** durch CerS-katalysierte *N*-Acylierung mit Pal-d₃ (**105**) zu Dihydroceramidderivat **112**. B) LC-MS-Chromatogramm der Lipidextrakte. Bei einer Retentionszeit von 24.32 min erscheint ein Signal für Dihydroceramid **112**, welches bei der Negativkontrolle fehlt und bei Zugabe des CerS-Inhibitors FB₁ stark an Intensität verliert. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

Die Identität des *de novo*-gebildeten fluorophormarkierten Dihydroceramids **112** wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Burkhard Kleuser durch zwei weitere Messergebnisse bestätigt. Zum einen stimmt das erhaltene Isotopenmuster gut mit dem theoretisch berechneten überein (Abbildung 31 A), zum anderen wurde eine spezifische Fragmentierung durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) bei 45 eV nachgewiesen, die in Zusammenhang mit der Molekülstruktur von **112** steht. Zusätzlich zu einem eher unspezifischen Wasserverlust (-18 Da) wurde eine zweifache Abspaltung von Fluorwasserstoff (jeweils -20 Da) beobachtet, was für die BODIPY-Einheit charakteristisch ist (Abbildung 31 B).^[424]

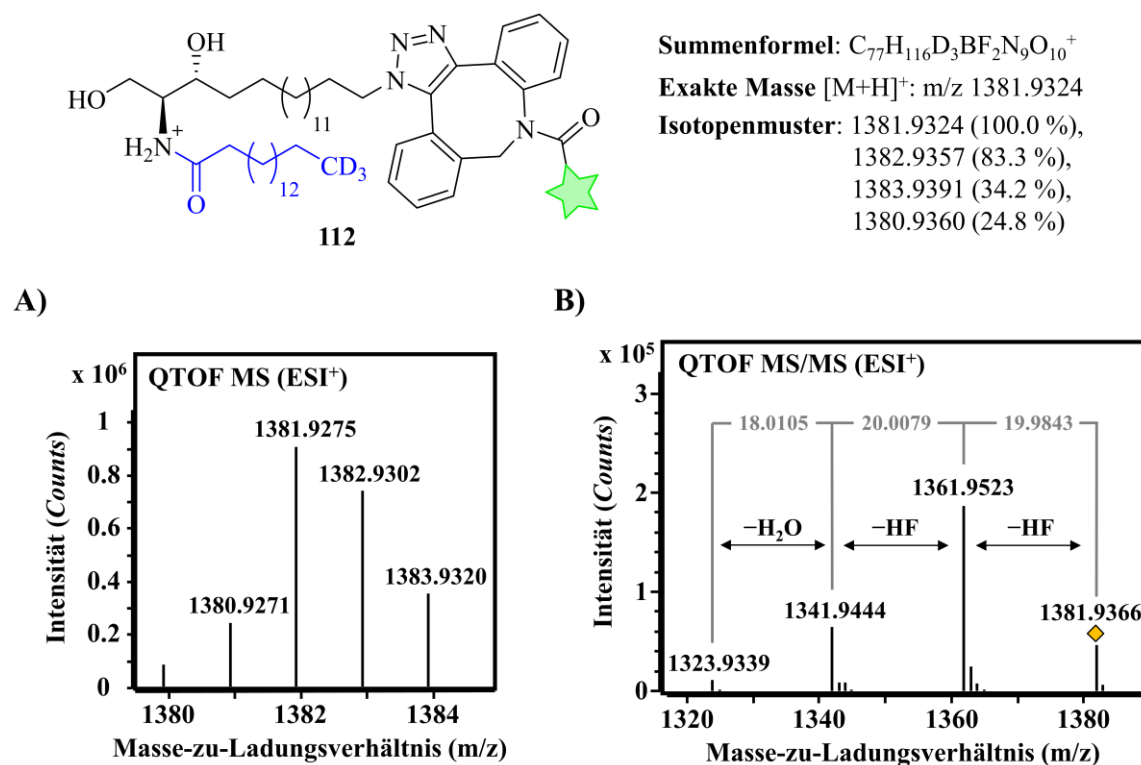


Abbildung 31: Massenspektrometrische Detektion des ersten möglichen *in vitro*-Metabolisierungsprodukts **112** ausgehend von Click-Konjugat **111**. Identifizierung der protonierten Dihydroceramid-BODIPY-Spezies durch A) Isotopenmuster, welches den Berechnungen entspricht und B) MS/MS-Analyse, bei der zwei charakteristische HF-Abspaltungen zu beobachten sind. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

Anschließend wurde untersucht, ob Dihydroceramid desaturase (DEGS) als nächstes Enzym in der *de novo*-Synthesekaskade das sterisch anspruchsvolle BODIPY-Dihydroceramid **112** durch Einführung der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 oxidieren kann (Abbildung 32 A).

Dazu wurden die Proben von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger mit dem QTOF-Instrument repräsentativ für **113** auf m/z 1379.9167 untersucht. Für das deuterierte und fluoreszenzmarkierte Ceramid **113** wurde ein Signal mit einer im Vergleich zum BODIPY-Dihydroceramid **112** kürzeren Retentionszeit von 23.87 Minuten detektiert. Dieses Signal fehlte in der Negativkontrolle und war in Gegenwart des CerS-Inhibitors Fumonisin B₁ (FB₁) nahezu vollständig verschwunden (Abbildung 32 B). Die Signalintensität des BODIPY-Ceramids **113** war ungefähr eine Größenordnung geringer als die des BODIPY-Dihydroceramids **112**. Da die geringere Bildung von Ceramiden in Bezug auf Dihydroceramide bekannterweise eine Einschränkung des mikrosomalen *in vitro*-Assays darstellt, können keine Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Affinitäten der beteiligten Enzyme CerS und DEGS gezogen werden.^[109]

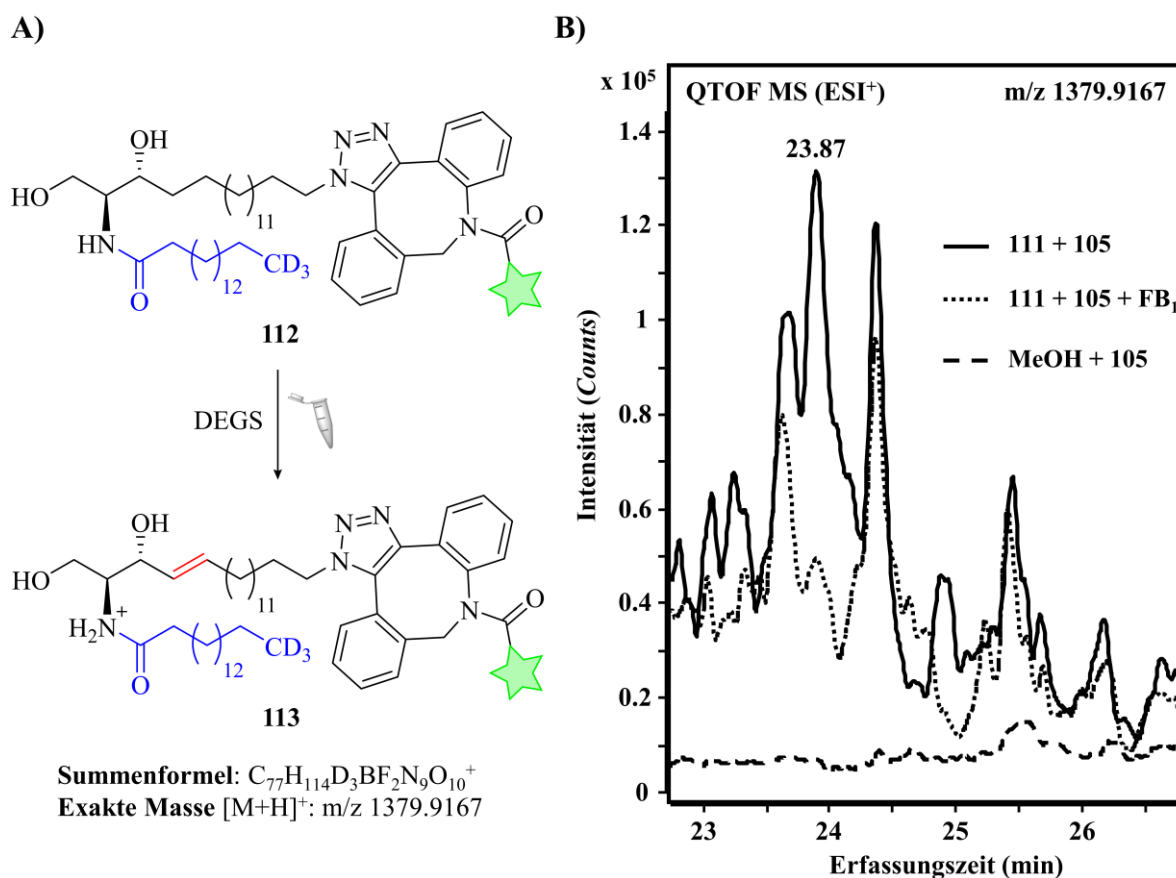


Abbildung 32: A) Mikrosomale Metabolisierung des Dihydroceramid-BODIPYs **112** durch DEGS-katalysierte Oxidation zu Ceramid **113**. B) LC-MS-Chromatogramm der Lipidextrakte. Bei einer Retentionszeit von 23.87 min wird ein Signal für Ceramid **113** detektiert, welches bei der Negativkontrolle fehlt und bei Zugabe des CerS-Inhibitors FB₁ stark an Intensität verliert. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

Das Endprodukt der *de novo*-Synthese, d₃-C₁₆-Ceramid-BODIPY **113**, wurde auch durch das erhaltene Isotopenmuster bestätigt, welches dem theoretisch berechneten Muster entspricht (Abbildung 33 A). Nach der MS/MS-Fragmentierung wurde, wie zuvor beim Dihydroceramid-analogon, eine für die BODIPY-Einheit typische Abspaltung zweier HF-Moleküle mit einem Massenverlust von jeweils 20 Da beobachtet (Abbildung 33 B).

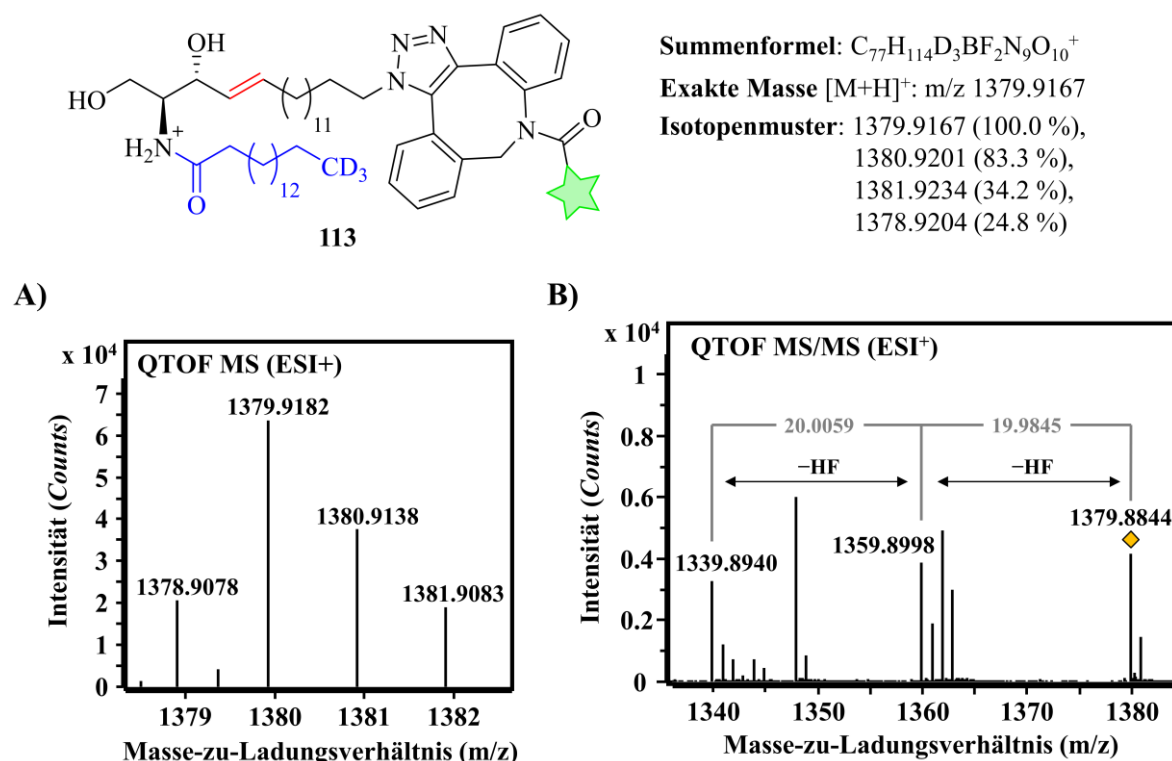


Abbildung 33: Massenspektrometrische Detektion des Ceramidderivats **113** als finales *de novo*-Syntheseprodukt ausgehend von Dihydroceramidanalogen **112**. Identifizierung der protonierten Ceramid-BODIPY-Spezies durch A) Isotopenmuster, welches den Berechnungen entspricht und B) MS/MS-Analyse, bei der zwei charakteristische HF-Abspaltungen zu beobachten sind. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in *Organic & Biomolecular Chemistry* veröffentlicht.^[422]

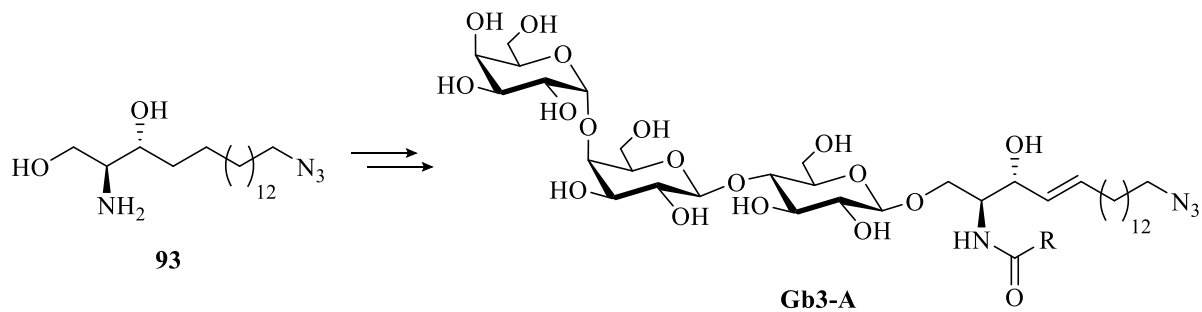
Zusammenfassend werden ω -N₃-Sphingarin (**93**) und das BODIPY-Sphingarin-Konjugat **111** von den metabolisierenden Enzymen der *de novo*-Sphingolipidsynthese CerS und DEGS als Substrate erkannt und umgesetzt. Die Ergebnisse demonstrieren erstmals die enzymatische Umsetzung eines Sphingarin-Fluorophor-Konjugats mit einem Molekulargewicht von über 1140 g·mol⁻¹ und den Nachweis seiner Metaboliten durch einen *in vitro*-LC-MS(/MS)-Test. Daher erlauben die in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Markus Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) und Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführten Experimente erste Hinweise auf die Substratazeptanz

von Sphingolipid-metabolisierenden Enzymen in Bezug auf Molekülgröße oder -gewicht der entsprechenden fluoreszierenden Analoga. Die Verwendung des Triazol-Rohprodukts, welches nicht weiter aufgereinigt wurde, ermöglicht eine schnelle und qualitative Aussage darüber, ob der Sphingolipidmetabolismus nach der Click-Reaktion in Zellen weiterhin stattfinden kann. Darüber hinaus zeigen die durchgeführten Studien erstmals mehr als nur eine konsekutive enzymatische Umsetzung eines fluorophormarkierten Sphingolipids in einem zellfreien System unter Verwendung von LC-MS(/MS).

Anders als für nicht-konjugiertes ω -N₃-Sphingamin (**93**) wurde für BODIPY-Sphingamin (**111**) kein Phosphorylierungsprodukt nachgewiesen. In der Probe mit SphK1 wurde kein von der Negativkontrolle unterscheidbares Signal für den erwarteten Wert m/z 1220.6502 beobachtet, während die Funktionalität des Enzyms durch eine begleitende Positivkontrolle (Bildung von ω -N₃-Sphingamin-1-phosphat aus ω -N₃-Sphingamin) verifiziert wurde. Die Ergebnisse weisen somit auf eine geringere Toleranz von SphK1 hinsichtlich Substratgröße und -gewicht von **111** oder auf eine SphK1-Hemmung durch Bestandteile des Click-Rohprodukts hin.

Alles in allem wurde eine allgemeine Methode zur Aufklärung der *de novo*-Biosynthese von Sphingolipiden mit Hilfe von Azidosphingaminanalogon **93**, der Fluoreszenzmikroskopie und hochauflösender Massenspektrometrie entwickelt. Die Fluoreszenzbildgebung lebender Zellen ergab, dass Derivat **93** wie natives endogenes Sphingamin in der ER-Membran lokalisiert ist, was das physiologische Verhalten der clickbaren Spezies bestätigt. Mit dem *in vitro*-Assay wurde gezeigt, dass das BODIPY-Sphingamin-Konjugat **111** trotz erhöhter Molekülgröße und veränderter Polarität weiter zu (Dihydro-)Ceramidspezies umgesetzt wird. Somit ist Azid **93** eine nützliche Verbindung für die Untersuchung der *Downstream*-Metaboliten von Sphingamin. Click-Reaktionen mit Alkinfluorophoren und *in vitro*-Tests auf LC-MS(/MS)-Basis liefern detaillierte Einblicke in (patho-)physiologische Prozesse, was die Entwicklung von neuartigen Sphingolipidmetabolismus-basierter Therapeutika gegen verschiedene humane Krankheiten ermöglichen soll.

In einem Projekt von Dr. Thomas Klein und Dr. Jan Schlegel aus den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Nurcan Üçeyler (Universitätsklinikum Würzburg) und Prof. Dr. Markus Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) wurde ω -N₃-Sphingamin (**93**) in, aus induzierten pluripotenten Stammzellen generierten, sensorischen Neuronen als potentielle Vorstufe von bio-orthogonal funktionalisiertem Globotriaosylceramid (**Gb3-A**) eingesetzt (Schema 29).



Schema 29: Mögliche Metabolisierung von ω -N₃-Sphingamin (**93**) zu clickbarem Globotriaosylceramid (**Gb3-A**) (R: Fettsäurerest).

Die Gb3-Ansammlung in Körperzellen und Organen, die auf einem genetisch bedingten Defekt von α -Galactosidase A beruht, ist Auslöser der lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Fabry (FD) (Kapitel 2.2.2).^[425] Die Pathophysiologie der FD-assoziierten Small-Fiber-Neuropathie ist durch thermische Hyposensitivität, auslösbare brennende Schmerzen in Händen und Füßen sowie periphere Denervierung gekennzeichnet und ist bis *dato* nicht vollständig verstanden.^[426]

Um einen direkten Zusammenhang zwischen Gb3 und der Small-Fiber-Neuropathie bzw. dem Schmerz aufzuklären, wurde von Klein *et al.* ein neues *in vitro*-Fabry-Krankheitsmodell entwickelt. Während Gb3 in fixierten Zellen mit Shiga-Toxin visualisiert werden konnte, fand das ω -N₃-Vorläufermolekül **93** Einsatz bei der Lebendzellbildung (Abbildung 34).

Die Neuronen einer gesunden Person wurden über Nacht mit ω -N₃-Sphingamin (**93**) inkubiert, sodass dessen Metabolisierung weitmöglichst vorangeschritten war (z. B. bis zu **Gb3-A**), bevor die Sphingolipidvisualisierung mit dem membranpermeablen DBCO-BODIPY-Farbstoff **110** über SPAAC stattfand. Mitochondrien wurden spezifisch mit MitoTracker Deep Red angefärbt. Vor allem in direkter Nähe von Sphingamin(metaboliten)-Ansammlungen wurden phänotypisch Mitochondrienfragmentierungen und -verkleinerungen in sensorischen Neuriten beobachtet (Abbildung 34 A). Die Farbstoffkontrolle, bei der keine Sphingolipidakkumulation durch Inkubation mit **93** induziert wurde, zeigte dagegen keine auffälligen Mitochondrienformen (Abbildung 34 B). Weiterhin wurde in Neuronen eines FD-Patienten ein behinderter mitochondrialer Transport durch Sphingamin(metaboliten)-Ansammlung beobachtet (Abbildung 34 C).

Die genannten Fluoreszenzmikroskopie-Experimente wurden von Dr. Jan Schlegel (AG Prof. Dr. Markus Sauer, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) durchgeführt und ausgewertet.

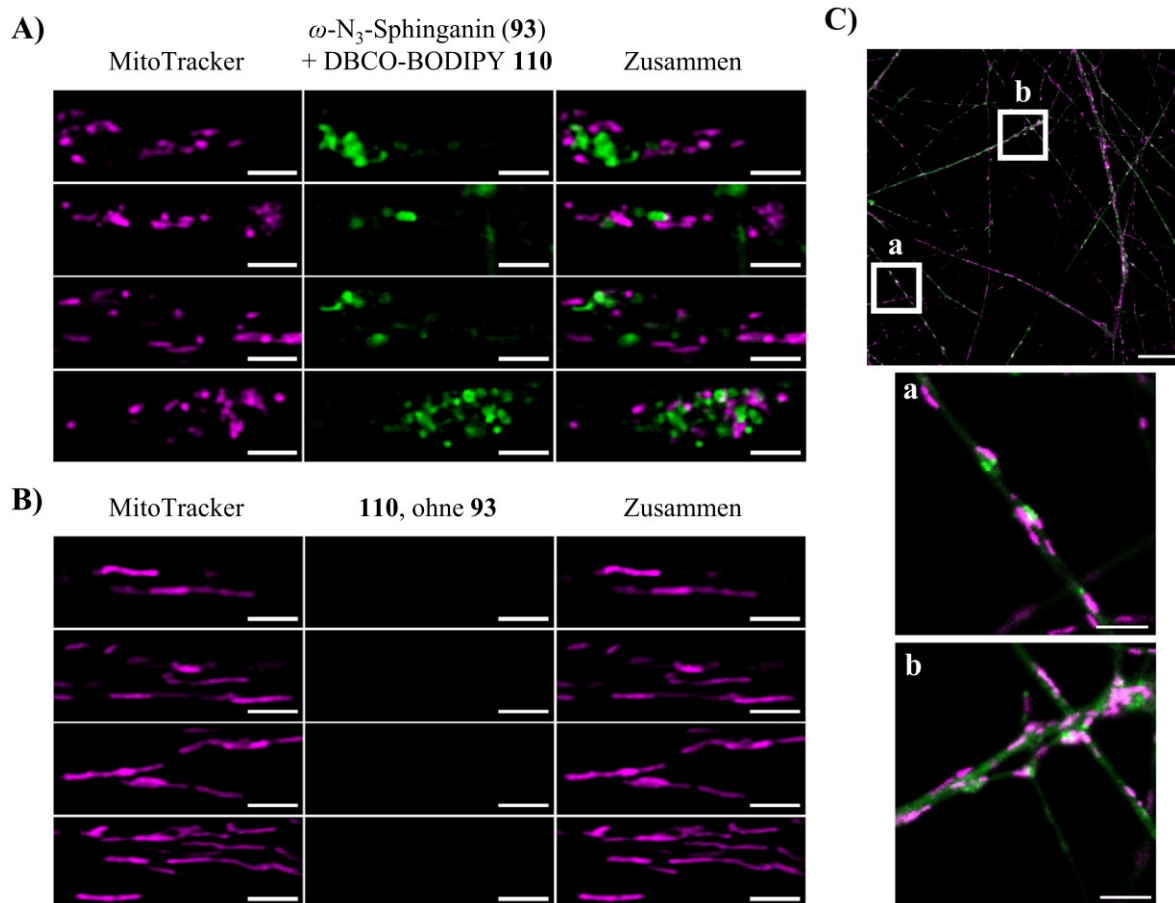


Abbildung 34: Hochaufgelöste Zweifarbenaufnahmen von reifen Kontroll- (A, B) und FD-1-Neuronen (C) mittels strukturierter Beleuchtungsmikroskopie (Lattice-SIM). A) Neuronen, die über Nacht mit $1\ \mu\text{M}$ $\omega\text{-N}_3\text{-Sphingarin (93)}$, dann für 30 min mit $1\ \mu\text{M}$ DBCO-PEG₄-BODIPY **110** und $100\ \text{nM}$ MitoTracker Deep Red inkubiert wurden. B) Neuronen, die für 30 min mit $1\ \mu\text{M}$ **110** und $100\ \text{nM}$ MitoTracker inkubiert wurden (Farbstoffkontrolle). C) Neuronen des Fabry-Patienten-1, die über Nacht mit $1\ \mu\text{M}$ **93**, dann für 30 min mit $1\ \mu\text{M}$ **110** und $100\ \text{nM}$ MitoTracker inkubiert wurden. Die Vergrößerungen zeigen Mitochondrien/Sphingarin(metaboliten)-Interaktion (a) und mögliche mitochondriale Blockade durch Sphingarin(metaboliten)-Akkumulation (b). Maßstabsbalken: $2\ \mu\text{m}$ (A, B), $25\ \mu\text{m}$ (C), $5\ \mu\text{m}$ (a, b). Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Thomas Klein (AG Prof. Dr. Nurcan Üçeyler, Uniklinikum Würzburg) und Dr. Jan Schlegel (AG Prof. Dr. Markus Sauer, JMU Würzburg) durchgeführt. Unveröffentlichte Ergebnisse.

Insgesamt deutet die, von den Kooperationspartnern durchgeführte, morphologische Analyse auf neuronale Gb3-Akkumulationen mit gestörter lysosomaler Integrität und mitochondrialer Beeinträchtigung hin, die möglicherweise einer peripheren Denervation zugrunde liegen. Die Studie von Klein *et al.* präsentiert erste Einblicke in Krankheitsmechanismen bei FD, die Gb3 direkt mit neuronaler Funktionalität verknüpfen. Künftig können patientenspezifische Krankheitsmechanismen in einem mehrdimensionalen Ansatz untersucht werden. Dies ermöglicht eine zielgerichtete Behandlung, die nicht nur auf das defiziente Enzym $\alpha\text{-Galactosidase A}$ wirkt, sondern auch Zelldefekte durch erhöhte neuronale Gb3-Last verhindert.

4.1.3.7 1-Azidosphingolipide

Die modifizierten Sphingoidbasen ω -N₃-Sphinganin (**93**) und ω -N₃-Sphingosin (**47**), bei denen sich die Azidgruppe am Kettenende des hydrophoben Lipidschwanzes befindet, werden wie ihre natürlichen Gegenstücke enzymatisch metabolisiert. Sowohl für das Sphinganin- als auch für das Sphingosinanalogon bestätigten die durchgeführten massenspektrometrischen Analysen die SphK1-katalysierte Phosphorylierung der primären Hydroxygruppen zum entsprechenden Phosphat (Kapitel 4.1.3.4 und 4.1.3.6).

Da Sphingosinkinase 1 (SphK1) bei verschiedenen Krebsarten überexprimiert wird und deren erhöhte Aktivität mit Tumorangiogenese und Resistenz gegen Bestrahlung und Chemotherapie in Verbindung steht, spielt deren gezielte Hemmung eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuer Anti-Tumor-Wirkstoffe in der Krebsforschung.^[427,428] Dieser Bedarf an Kinaseinhibitoren führte bereits zur Synthese zahlreicher tumorsuppressiver Wirkstoffkandidaten.

Potente kompetitive SphK1-Inhibitoren, deren molekulare Strukturen sich von Sphingoidbasen ableiten, sind beispielsweise *L-threo*-Sphinganin (Safingol) (**114**) und *N,N*-Dimethylsphingosin (**115**) (Abbildung 35 A).^[429,430]

Ein anderer Ansatz der Tumorbekämpfung stellt der Einsatz von Sphingolipidderivaten ohne primäre Hydroxyfunktion dar. Das Fehlen der OH-Kopfgruppe verhindert eine SphK1-katalysierte Metabolisierung zum proliferativen Phosphat und den anschließenden irreversiblen Abbau des Lipids. Die daraus resultierende erhöhte zelluläre Ceramid(derivat)-Konzentration induziert Apoptose und unterdrückt das Tumorgewebewachstum. Zu dieser Kategorie der Wirkstoffkandidaten gehören z. B. 1-Desoxysphingosin (Spisulosin) (**116**) und Enigmol (**117**) (Abbildung 35 B).^[431,432]

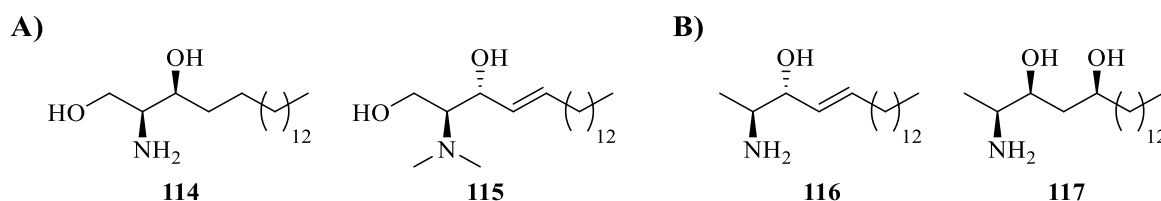


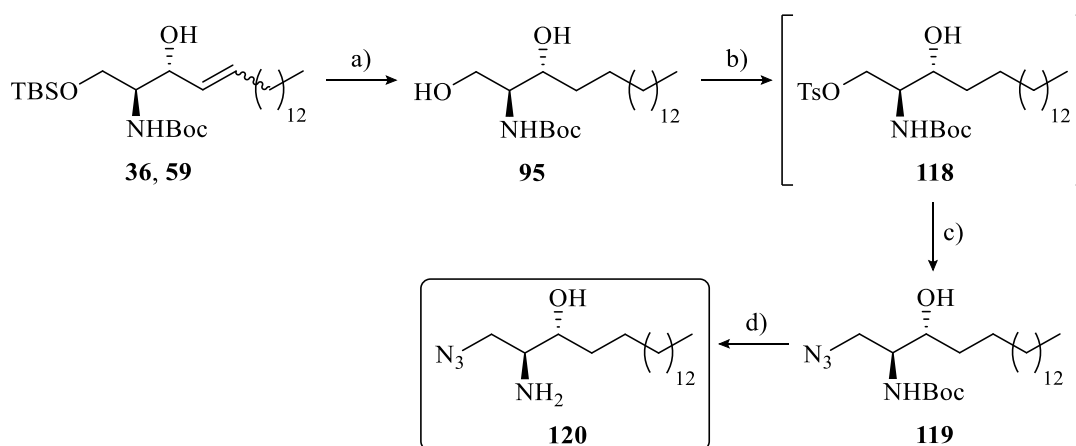
Abbildung 35: Beispiele für SphK1-Inhibitoren (A) und 1-Desoxysphingolipidderivate (B) mit tumorsuppressiver Wirkung.

Durch den Austausch der primären Hydroxyfunktion mit einer Azidgruppe sollten Sphingosin- und Sphinganinderivate erhalten werden, die potenzielle kompetitive Kinaseinhibitoren mit

tumorsuppressiven Eigenschaften darstellen. Die Einführung der Azidgruppe an Position 1 verhindert einerseits gezielt den SphK1-katalysierten Biosyntheseschritt, ermöglicht andererseits die Fluoreszenzmarkierung des Sphingolipidderivats für Metabolismusstudien mittels bildgebender Mikroskopie durch Konjugation mit einem alkinfunktionalisierten Farbstoff.

Die Synthesen der an Position 1 azidfunktionalisierten Sphingoidbasen 1-N₃-Sphinginin (**120**) und 1-N₃-Sphingosin (**123**) wurden zusammen mit Pauline Pfister im Rahmen einer Bachelorarbeit in unserer Forschungsgruppe entwickelt.^[316] Diese sollten in der vorliegenden Doktorarbeit reproduziert werden, um ausreichende Substanzmengen der modifizierten Biomoleküle für verschiedene Projekte interdisziplinärer Kooperationen zu erhalten.

1-Azidosphinginin (**120**) wurde ausgehend von dem zuvor isolierten *E/Z*-Isomerengemisch bestehend aus **36** und **59** (Kapitel 4.1.1) über eine Tosylierung und anschließender nukleophiler Substitution als Schlüsselschritt zur Einführung der Azidfunktion über vier Stufen erhalten (Schema 30).



Schema 30: Durchgeführte Synthese von 1-N₃-Sphinginin (**120**) ausgehend vom *E/Z*-Isomerengemisch aus den geschützten Sphingosinderivaten **36** und **59**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) H₂, Pd/C, MeOH, RT, 4 d, 64 %; b) TsCl, DMAP, NEt₃, DCM, 0 °C→RT, 2.5 h; c) NaN₃, DMF, 50 °C, 19 h, 54 % (2 Stufen); d) AcCl, MeOH, 0 °C→RT, 22 h, 94 %.

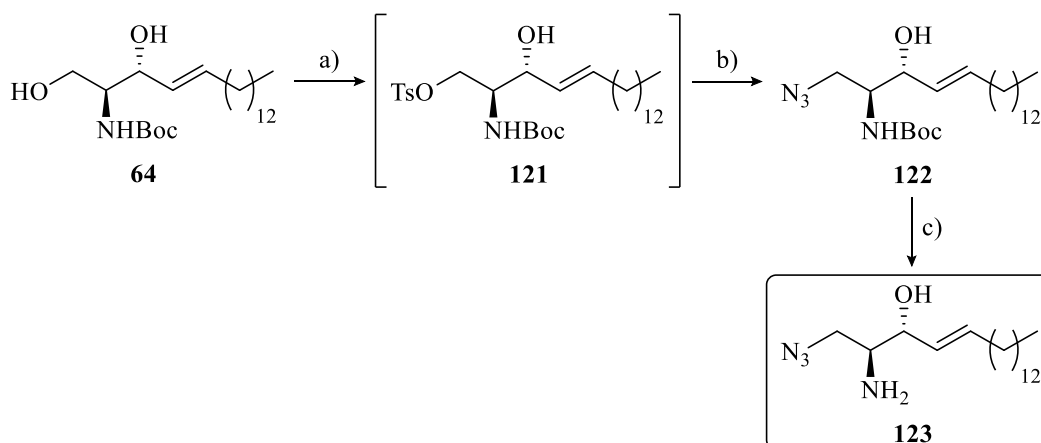
Im ersten Schritt wurde durch Hydrierung mit elementarem Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle sowohl die *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe von **36** bzw. **59** entfernt als auch die C-C-Doppelbindung reduziert. Da das *Z*-konfigurierte Nebenprodukt **59** der Olefinkreuzmetathesereaktion (Kapitel 4.1.1) ebenfalls zum Aufbau des gesättigten Sphingolipidgerüsts eingesetzt werden konnte, handelt es sich hierbei um eine ressourcenschonende Darstellungsmethode von *N*-Boc-Sphinginin (**95**) (Schema 30).

Nach Freisetzung der primären Hydroxygruppe wurde diese zu einer guten Abgangsgruppe umgewandelt. Dazu wurde Alkohol **95** in trockenem Dichlormethan mit Tosylchlorid versetzt, wobei zusätzlich Triethylamin als nicht-nukleophile Base zum Abfangen des Chlorwasserstoffs und *N,N*-Dimethylpyridin-4-amin (DMAP) als nukleophiler Katalysator eingesetzt wurden. Die Wahl der sterisch anspruchsvollen Abgangsgruppe und die Zugabe des Chlorids unter Eisbadkühlung sollten eine möglichst hohe Regioselektivität erzielen, sodass lediglich die primäre Hydroxygruppe in Gegenwart der sekundären reagiert. Zusätzlich wurde genau ein Äquivalent des Chlorids eingesetzt, um eine zweifache Tosylierung des Diols zu unterbinden. Die wässrig-saure Aufarbeitung und Extraktion mit Dichlormethan wurde nach 2.5 Stunden Reaktionszeit zur Verhinderung einer Rückreaktion durch Hydrolyse zügig durchgeführt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das erhaltene Tosylrohprodukt **118** ohne weitere Reinigung und Charakterisierung direkt zu 1-*N*₃-*N*-Boc-Sphingalin (**119**) umgesetzt. Die S_N2-Reaktion erfolgte mit einem dreifachen Überschuss an Natriumazid in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) bei 50 °C über Nacht. Azid **119** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 54 % über zwei Stufen isoliert (Schema 30).

Die finale Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe erfolgte mittels *in situ*-Generierung von HCl. Dazu wurde Carbamat **119** in wasserfreiem Methanol mit Acetylchlorid versetzt und alle flüchtigen Bestandteile nach vollständigem Umsatz destillativ entfernt. Nach wässrig-basischer Aufarbeitung, Extraktion mit Dichlormethan und anschließendem Entfernen des Lösungsmittels wurde 1-Azidosphingalin (**120**) mit einer sehr guten Ausbeute von 94 % erhalten. In Analogie zur Synthese von ω -*N*₃-Sphingalin (**93**) kam es aufgrund des gesättigten Lipidgerüsts und des fehlenden Allylmotivs zu keinen Nebenreaktionen (Kapitel 4.1.3.6), sodass eine weitere Reinigung durch z. B. Säulenchromatographie nicht nötig war.

Die erhaltenen NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten entsprechen den bereits bekannten Werten aus vorangegangenen Arbeiten innerhalb unserer Forschungsgruppe und bestätigten somit die erfolgreiche Synthese des an Position 1 azidmodifizierten Sphingalin-derivats **120**.^[316,317]

Bei der Synthese des Sphingosinanalogs **123** wurden die Tosylierung und Azidierung analog zu **120** durchgeführt, wobei *N*-Boc-Sphingosin (**64**) als *E*-konfigurierte Ausgangssubstanz diente (Schema 31).



Schema 31: Durchgeführte Synthese von 1-N₃-Sphingosin (**123**) ausgehend von *N*-Boc-Sphingosin (**64**) durch Tosylierung der primären Hydroxyfunktion als Schlüsselschritt. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) TsCl, DMAP, NEt₃, DCM, 0 °C→RT, 2.5 h; b) NaN₃, DMF, 50 °C, 19 h, 22 % (2 Stufen); c) TFA, DCM, 0 °C, 3.5 h, 53 %.

Aufgrund der vorhandenen C-C-Doppelbindung ist nach Einführung der Azidgruppe eine thermisch induzierte, intramolekulare 1,3-dipolare Azid-Olefin-Cycloaddition (IAOC) unter Ausbildung eines 1,2,3-Δ²-Triazolinderivats **124** möglich. Nach schneller Freisetzung von elementarem Stickstoff kann ein Pyrrolinderivat erhalten werden.^[317,433,434] Diese Nebenreaktion nach der Azidierung stellt eine mögliche Erklärung der im Vergleich zur gesättigten Lipidvariante (54 %) geringeren Ausbeute von 22 % dar.

Im letzten Schritt wurde zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe das Carbamat **122** mit Trifluoressigsäure (TFA) versetzt. Nach 3.5 Stunden Reaktionszeit wurde mit 0.5-molarer Natronlauge aufgearbeitet und mit Essigsäureethylester extrahiert. Für eine erhöhte Elutionskraft sowie eine bessere Trennleistung wurde bei der anschließenden säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel wässrige Ammoniaklösung als Additiv zur mobilen Phase aus Dichlormethan und Methanol gegeben. Das gewünschte 1-N₃-Sphingosin (**123**) wurde mit 53 % Ausbeute isoliert (Schema 31).

Auch hier entsprechen die erhaltenen NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten den bekannten Werten aus vorangegangenen Arbeiten unserer Forschungsgruppe und bestätigten somit die erfolgreiche Synthese des clickbaren Sphingosinanalogs **123**.^[316,317]

Im bereits erwähnten Projekt von Dr. Franziska Solger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Rudel (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) (Kapitel 4.1.3.4) wurde neben ω-Azidosphingosin (**47**) das synthetisierte 1-Azidosphingosin (**123**) zur Untersuchung des Sphingosineinflusses auf das Überleben intrazellulärer Gonokokken eingesetzt.^[407,408]

Durch den Austausch der primären Hydroxygruppe von Sphingosin mit einer Azidfunktion wird die SphK-katalysierte Metabolisierung zum S1P-Derivat indirekt gehemmt, sodass für 1-N₃-Sphingosin (**123**) eine stärkere toxische Wirkung auf die Bakterien *Neisseria gonorrhoeae* erwartet wird als für natürliches und ω -N₃-modifiziertes Sphingosin. Diese Annahme wurde von Dr. Franziska Solger durch die Aufnahme von Wachstumskurven genauer untersucht.^[407] Bei der höchsten getesteten Konzentration von 20 μ M hatte Sphingosin eine ähnlich toxische Wirkung auf Gonokokken wie die Behandlung mit dem Antibiotikum Kanamycin. Die zweithöchste Sphingosindosis von 10 μ M verursachte eine Verringerung des Neisserienwachstums, wohingegen 5 μ M keine Auswirkungen mehr auf die Replikation hatte. Dagegen wurde das Wachstum der Neisserien durch 1-N₃-Sphingosin (**123**) bereits bei einer Konzentration von 5 μ M verringert, während eine Dosis von 10 μ M für ein effektives Abtöten der Bakterien ausreichte. Bei zuletzt genannter Konzentration wurde sogar die antibakterielle Wirkung von Kanamycin übertroffen (Abbildung 36).^[407,408]

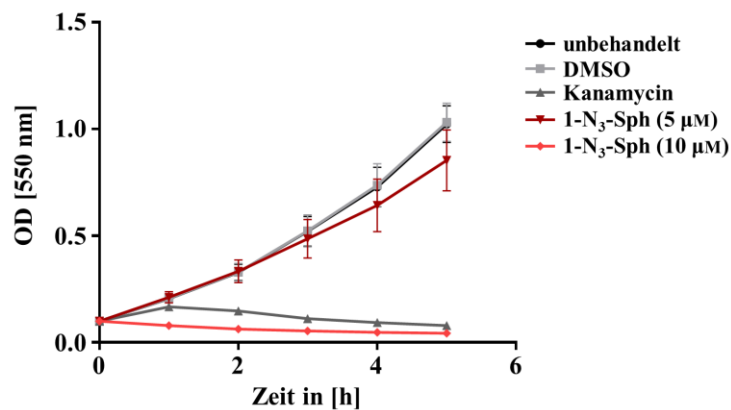


Abbildung 36: Effekt von 1-N₃-Sphingosin (**123**) auf das Wachstum von *N. gonorrhoeae*. Flüssigkulturen wurden mit Azid **123** (5 μ M und 10 μ M) behandelt, wobei das Gonokokkenwachstum durch die stündliche Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt wurde. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Franziska Solger (AG Prof. Dr. Thomas Rudel, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* entnommen und modifiziert.^[408]

Die im Vergleich zu ω -N₃-Sphingosin (**47**) stärkere antibakterielle Wirkung von 1-N₃-Sphingosin (**123**) wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thomas Rudel in infizierten epithelialen Bindehautzellen nachgewiesen. Die SIM-Aufnahmen zeigten eine drastische Reduktion der Gonokokken, die 1-Azidosphingosin (**123**) in ihrer Membran eingebaut hatten (Abbildung 37). Dies wurde zusätzlich von Dr. Franziska Solger durch Quantifizierung der überlebenden Gonokokken bestätigt (Abbildung 38).

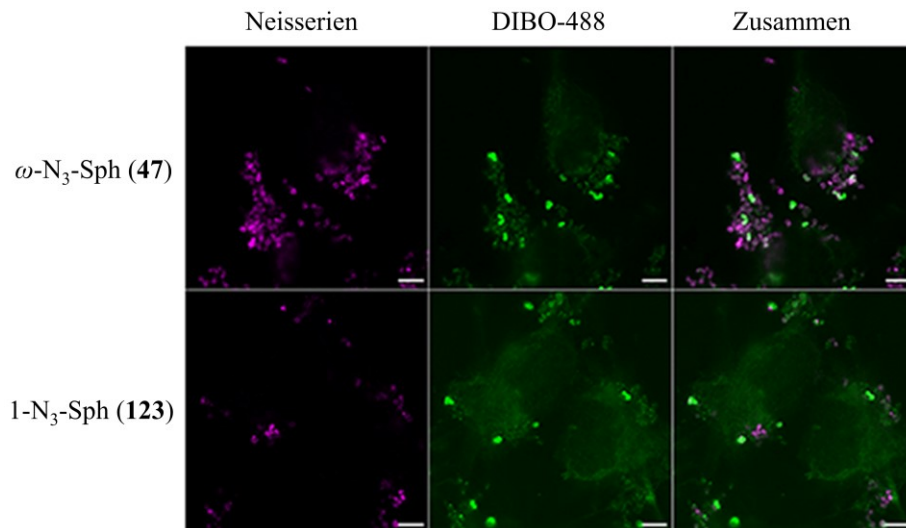


Abbildung 37: Vergleich der bakteriziden Effekte von ω -N₃-Sphingosin (**47**) und 1-N₃-Sphingosin (**123**) mittels hochauflösender Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM). Fluoreszenzaufnahmen von Chang-Zellen, die mit **47** (10 μ M) oder **123** (5 μ M) bei 37 °C für 30 min inkubiert und 4 h mit *Neisseria gonorrhoeae* infiziert wurden. Die Visualisierung der Sphingosinderivate erfolgte durch Click-Reaktion mit DIBO-Alexa Fluor 488 (grün) und die der Bakterien durch Cy2-markierte Antikörper (magenta). Maßstabsbalken: 5 μ m. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Franziska Solger (AG Prof. Dr. Thomas Rudel, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* entnommen und modifiziert.^[408]

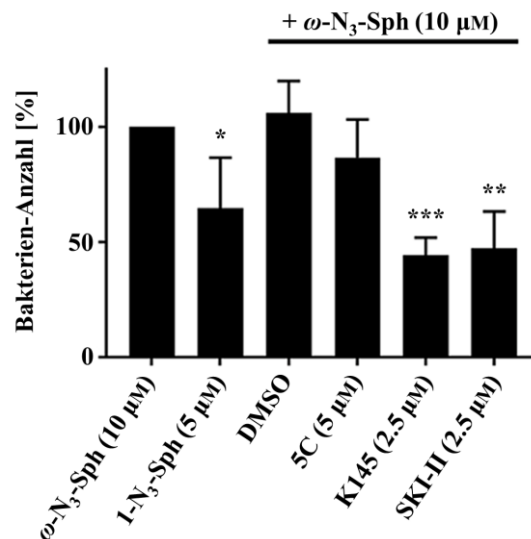
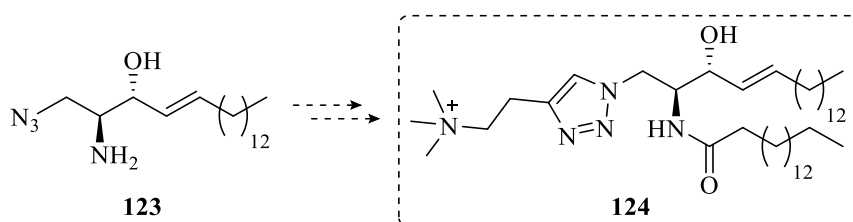


Abbildung 38: Vergleich der bakteriziden Effekte von ω -N₃-Sphingosin (**47**) und 1-N₃-Sphingosin (**123**) mittels Quantifizierung von überlebenden Gonokokken 4 h nach der Infektion von Sphingosinderivat-behandelten Zellen. Um die Phosphorylierung zu verhindern wurde entweder ω -N₃-Sph (**47**) in Kombination mit SphK1-Inhibitoren oder 1-N₃-Sph (**123**) eingesetzt. n = 3 (unabhängige Experimente) und *p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001 (relativ zu ω -N₃-Sph). Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Franziska Solger (AG Prof. Dr. Thomas Rudel, JMU Würzburg) durchgeführt. Die Abbildung wurde aus *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* entnommen und modifiziert.^[408]

Wird die Biosynthese durch die Substitution der primären Hydroxygruppe oder durch den Einsatz von SphK1-Inhibitoren zum Phosphat verhindert, so steigt die Toxizität gegenüber den Bakterien aufgrund der höheren Sphingosin(derivat)konzentration. Zusammenfassend zeigten die von den Kooperationspartnern erhaltenen Daten, dass invasive *N. gonorrhoeae* Sphingosin aus der Wirtszelle aufnehmen und in ihre Membran einbauen, wodurch das Überleben der Gonokokken reduziert wird.^[407,408]

In weiterführenden Experimenten sollen die, im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierten, bioorthogonal funktionalisierten Sphingolipidderivate 1-Azidosphinganin (**120**) und 1-Azidosphingosin (**123**) mit Hilfe eines zellfreien *in vitro*-Assays (Kapitel 4.1.3.6) hinsichtlich der enzymatischen Bildung von Ceramidderivaten untersucht werden. Werden die beiden Lipidanaloga von Ceramidsynthasen (CerS) akzeptiert und umgesetzt, so ist nach Einnahme der Verbindungen **120** und **123** eine Steigerung der Ceramidkonzentration in Zellen möglich. Zudem ist die SphK1-katalysierte Phosphorylierung aufgrund der Azidfunktion blockiert, sodass die Menge an proliferativem Phosphat geringgehalten wird. Die Azidolipide selbst oder deren gezielt entworfene Click-Konjugate mit Alkinen stellen möglicherweise SphK1-Inhibitoren und somit interessante tumorsuppressive Wirkstoffkandidaten gegen Krebs dar.

Darüber hinaus können weitere Inhibitoren für diverse Enzyme des Sphingolipidmetabolismus durch eine Kopfgruppenmodifikation dargestellt werden. So wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe zwei potenzielle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (ASM) ausgehend von **120** und **123** synthetisiert, bei denen aufgrund des eingeführten Triazolrings keine hydrolytische Abspaltung der kationischen Kopfgruppe stattfinden kann (Schema 32).^[317] Viele Krankheiten wie Krebs, Diabetes, Alzheimer, Major Depression oder Mukoviszidose stehen im Zusammenhang mit einer ASM-Überexpression, wodurch die gezielte Hemmung dieses Enzyms von großem medizinischen Interesse ist.^[435]



Schema 32: Anwendungsbeispiel von 1-Azidosphingolipiden: Entwicklung von potenziellen ASM-Inhibitoren. Sowohl Verbindung **124** als auch eine auf 1-N₃-Sphinganin (**120**) basierende Variante wurden von Philipp Stenzel (Masterarbeit, unveröffentlichte Ergebnisse) synthetisiert.^[317] Die biologischen Inhibitionstests stehen noch aus.

Um die Wirksamkeit der Inhibitor-kandidaten zu optimieren, können strukturelle Anpassungen sowohl durch Click-Reaktionen am Kopf als auch durch Amidkupplungen mit verschiedenen Carbonsäuren an der Seitenkette durchgeführt werden. Die Einführung eines Fettsäurerestes mit Benzyleinheit kann beispielsweise zu zusätzlichen attraktiven π - π -Wechselwirkungen mit aromatischen Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms führen und somit die kompetitiv inhibierenden Eigenschaften des Sphingolipidanalogons verstärken.

Ein anderes Anwendungsgebiet von 1-N₃-Sphingosin (**123**) und 1-N₃-Sphinganin (**120**) bzw. von den entsprechenden 1-N₃-Ceramiden ist die Darstellung von Glycosphingolipiden (GSL), bei denen die Kohlenhydrateinheit durch Click-Konjugation mit einem alkinfunktionalisierten Saccharid kovalent an den Lipidkopf gebunden wird. GSL fungieren auf der Oberfläche von eukaryotischen Zellen als Bindungsstellen für Pathogene wie Bakterien, Viren und Toxine.^[436] Ihnen wird eine entscheidende Rolle bei Infektionsprozessen und der Immunreaktion zugeschrieben, was diese Lipidklasse und die zugrundeliegenden Biosynthesewege zu wichtigen Angriffspunkten für unterschiedliche Therapien macht.^[437] Die Azide **120** und **123** können für die Synthese neuer potenzieller Inhibitoren für GSL-assoziierte Enzyme eingesetzt werden, wodurch lysosomale Speicherkrankheiten (Sphingolipidosen) adressiert werden.^[438]

Außerdem können GSL-Mimetika ohne glykosidische Bindung zwischen Kohlenhydrat- und Lipideinheit dargestellt werden, sodass diese hydrolyseresistent gegenüber endogenen Glycosidasen oder sauren Bedingungen sind. Wird z. B. das Sauerstoffatom der glykosidischen Bindung von α -Galactosylceramid (α -GalCer, KRN7000) durch eine Methylengruppe ersetzt, zeigt das erhaltene α -C-GalCer eine 100-fach höhere Anti-Tumor-Wirkung und einen 1000-fach stärkeren Effekt gegen Malaria.^[439] Für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Anwendungen auf Basis von GSL-Analoga können bekannte Synthesemethoden letztendlich um die Click-Konjugationsvariante mit 1-Azidosphingolipiden erweitert werden.^[439-444]

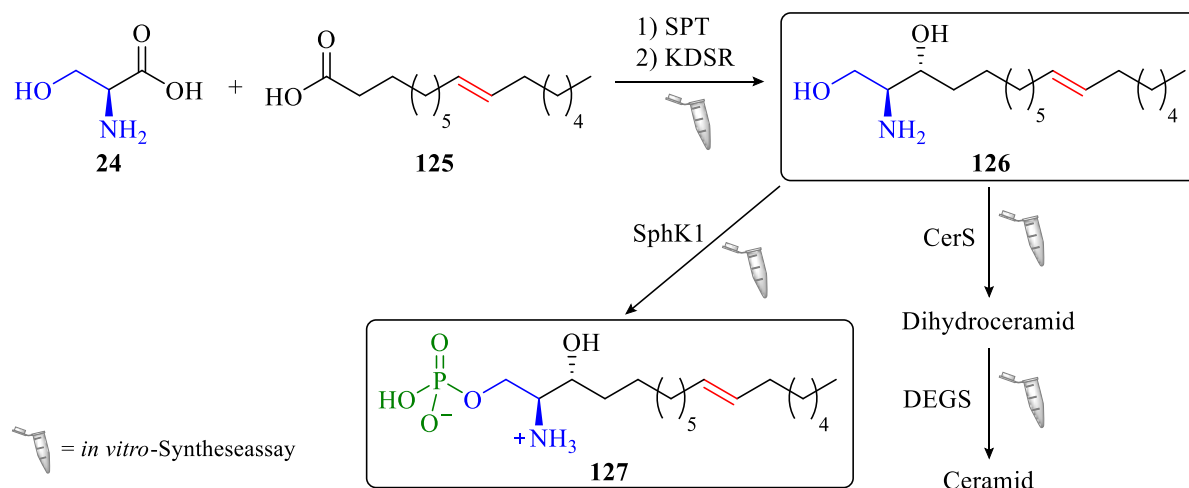
Neben Kohlenhydraten können auch bioaktive Peptide mit Hilfe von Click-Reaktionen unter Ausbildung eines Triazols kovalent an den Lipidkopf gebunden werden, wodurch therapeutisch interessante Konjugate erhalten werden. Ein Hauptaugenmerk der weltweiten Arzneimittelforschung liegt in der Entwicklung von neuen Peptid- bzw. Proteinwirkstoffen, deren Einnahme bislang auf Injektionen beschränkt ist. Bei oraler Einnahme, z. B. in Tablettenform, wird die Aufnahme der großen therapeutischen Moleküle durch die epitheliale Barriere des Darms verhindert.^[445] In einer 2020 veröffentlichten Studie von Duclos Jr. *et al.* zeigten Sphingolipid-Peptid-Konjugate basierend auf kurzkettigem C₆-Ceramid die Eigenschaft enge Zellbarrieren der Schleimhaut mittels Transzytose zu durchdringen.^[446] Hierfür wurde das Peptid über eine

Oximethereinheit mit dem Kopf des Ceramids verknüpft, wobei dessen primäre Hydroxygruppe zuvor durch Schutzgruppentechnik selektiv zur Aldehydfunktion oxidiert wurde. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierten 1-Azidosphingoidbasen **120** und **123** bzw. deren Ceramidderivate erlauben 1,3-dipolare Cycloadditionen mit alkinmodifizierten Peptiden und erweitern das Synthesekonzept von Sphingolipid-Peptid-Konjugaten mit verbesserter Bioverfügbarkeit um eine weitere Methode. Dieser neuartige Ansatz der lipidbasierten Arzneimittelabgabe unterscheidet sich erheblich von bisher bekannten Formulierungstechnologien.^[446]

4.1.4 Atypische Sphingolipide: Sphinganin- und S1P-Analoga

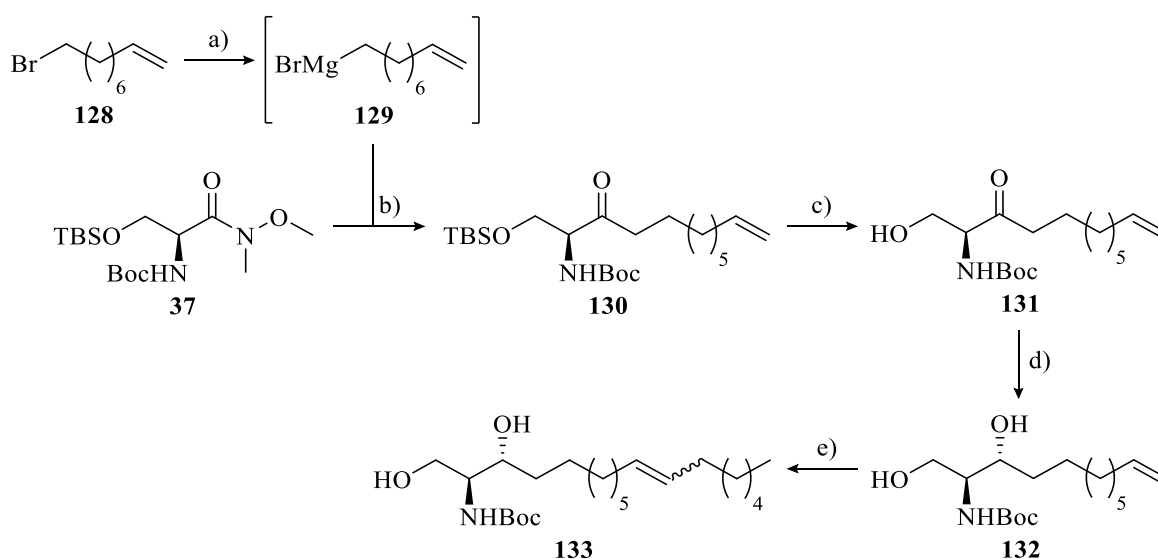
Eine Störung des Sphingolipidmetabolismus steht im Zusammenhang mit dem Auftreten von Typ 2-Diabetes (T2D).^[447] Die schwerwiegende Stoffwechselerkrankung tritt am häufigsten bei älteren Menschen, jedoch aufgrund von Fettleibigkeit, körperlicher Inaktivität und ungesunder Ernährung zunehmend bei Kindern und Jugendlichen auf.^[448] Diabetes (etwa 90 % Typ 2) stellt eines der am schnellsten wachsenden Gesundheitsproblemen des 21. Jahrhunderts dar. Im Jahr 2019 wurde die Zahl der Diabetesfälle weltweit auf 463 Millionen Menschen geschätzt und die Weltgesundheitsorganisation geht davon aus, dass Diabetes bis 2030 die siebthäufigste Todesursache sein wird.^[449,450] Mehrere Studien zeigten, dass Ceramid zu einer Insulinresistenz und zu Funktionsstörungen bzw. den Tod von Pankreas- β -Zellen führt und somit, wie bioaktives S1P, eine entscheidende Rolle bei der T2D-Entwicklung spielt.^[447,448,451-455] Palmitinsäure dient als Substrat sowohl für SPT für die *de novo*-Sphingolipidsynthese als auch von CerS für den Ceramidaufbau und hängt somit mit der Entwicklung der Krankheit T2D zusammen.

(*E*)-Hexadec-9-ensäure (*trans*-Palmitinsäure, TPA) (**125**), die v. a. über Milch und Fleisch von Wiederkäuern aufgenommen wird, korreliert dagegen mit einem verringerten T2D-Risiko, wobei der mechanistische Hintergrund unbekannt ist.^[456,457] Möglicherweise beruht die gesundheitsfördernde Wirkung von TPA auf deren Metabolismus. Es wurde bereits gezeigt, dass TPA von SPT zu atypischem 3-Ketosphinganin umgesetzt wird.^[112,458] Für weitere Untersuchungen von TPA-abgeleiteten Sphingolipidmetaboliten mittels hochauflösender Massenspektrometrie sollten daher entsprechende Standardsubstanzen synthetisiert werden (Schema 33).



Schema 33: Mögliche *de novo*-Biosynthese von atypischen Sphingolipiden, bei der (*E*)-Hexadec-9-ensäure (125) als Grundgerüstbaustein dient. Das Sphinginanalogon 126 und das phosphorylierte Derivat 127 sollten im Rahmen dieser Arbeit als MS-Standards für einen zellfreien mikrosomalen Metabolismusassay dargestellt werden.

Zu Beginn wurde der Versuch unternommen, die TPA-basierten (11*E*)-Sphingolipide ähnlich zu den Palmitinsäure-basierten Sphingolipiden (Kapitel 4.1.1) darzustellen, indem eine C-C-Knüpfung zwischen Weinreb-Amid 37 und einem Metallorganyl durchgeführt und anschließend das C₁₈-Gerüst mittels Olefinkreuzmetathese aufgebaut wird (Schema 34). Da sich die Doppelbindung zwischen C-11 und C-12 befinden sollte, wurde 9-Bromnon-1-en (128) als Ausgangssubstanz für die Grignard-Reaktion und Oct-1-en für die Metathesereaktion gewählt.

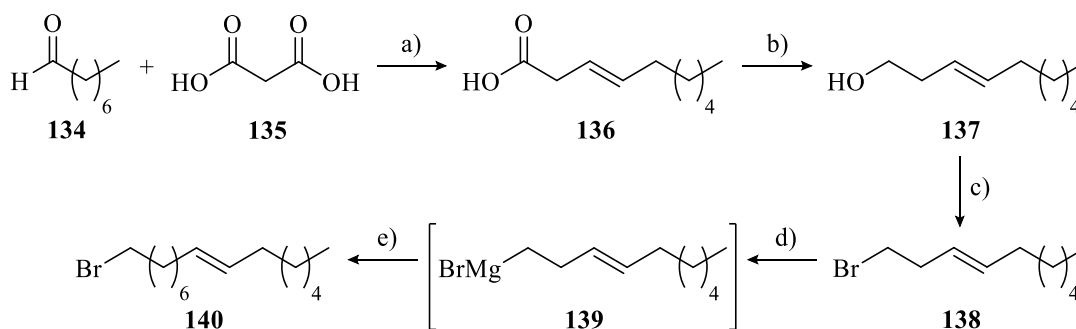


Schema 34: Durchgeführte Vorversuche zur Synthese von atypischen Sphingolipiden über eine Olefinkreuzmetathese als Schlüsselschritt zum Aufbau des C₁₈-Gerüsts. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Mg, Et₂O, RT, 30 min; b) THF, 0 °C → RT, 2 h, 90 %; c) TBAF, THF, 0 °C → RT, 30 min, 61 %; d) LiAl(O*t*Bu)₃H, EtOH, -78 °C, 84 %; e) Oct-1-en, Grubbs II-Kat., DCM, 55 °C, 2 h, 12 % (*E/Z*).

Nach der Synthese des Ketons **130** wurde zunächst die Silylschutzgruppe mit TBAF entfernt, um die Löslichkeit in Ethanol zu erhöhen. Das dabei gebildete β -Hydroxyketon **131** wurde für die stereoselektive Reduktion zum *anti*-1,2-Aminoalkohol **132** bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ in Ethanol portionsweise mit Lithiumtri-*tert*-butoxyaluminiumhydrid versetzt. Diol **132** wurde mit einer Ausbeute von 84 % isoliert und daraufhin einer Olefinkreuzmetathese mit Oct-1-en und dem Grubbs II-Katalysator unterzogen. Dabei wurde das *N*-Boc-Sphingininanalogon **133** mit einer Ausbeute von 12 % als nicht trennbares *E/Z*-Isomergemisch erhalten (Schema 34), sodass eine alternative Synthesemethode für die geplanten (11*E*)-Sphingolipidanaloga entwickelt werden musste.

Das isolierte Zwischenprodukt **132** kann in weiterführenden Arbeiten als Vorstufe für alkenfunktionalisierte Sphingolipidderivate dienen, die durch bioorthogonale iEDDA-Reaktionen mit Pyrimidyltetrazin-Fluorophoren eine Lebendzellmarkierung ermöglichen (Kapitel 4.1.3.3).

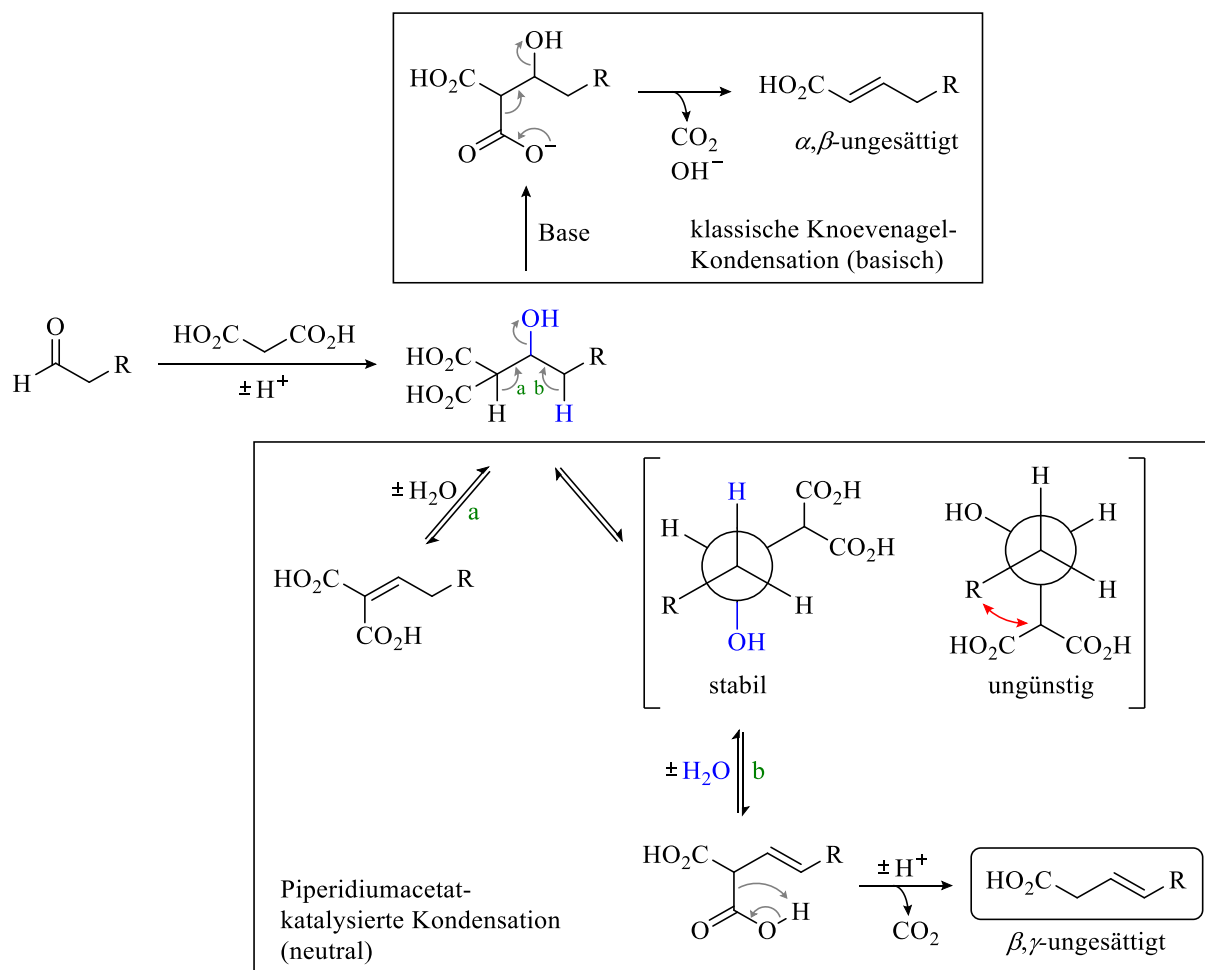
Bei der anschließend erfolgreich durchgeführten Synthese der atypischen Sphingolipide wurde zunächst der gesamte hydrophobe Lipidschwanz mit der *E*-konfigurierten C-C-Doppelbindung an der richtigen Position dargestellt, bevor dieser mit dem Kopfmotiv verknüpft wurde. Dazu wurde zuerst das langkettige bromierte Alken **140** synthetisiert (Schema 35), welches dann für die nachfolgende Grignard-Reaktion und Kopf-Schwanz-Verknüpfung zur Verfügung stand.



Schema 35: Durchgeführte Synthese des Bromalkens **140** ausgehend von Octanal (**134**) und Malonsäure (**135**) über eine Piperidiniumacetat-katalysierte Kondensationsreaktion zum Aufbau der *E*-konfigurierten C-C-Doppelbindung. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Piperidin, AcOH, DMSO, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 2,5 h, quant.; b) LiAlH_4 , THF, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 24 h, 66 %; c) PPh_3 , CBr_4 , DCM, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3 h, 99 %; d) Mg, Et_2O , RT, 45 min; e) 1,5-Dibrompentan, Li_2CuCl_4 , NMP, THF, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 20 h, 32 %.

Im ersten Schritt wurde aus Octanal (**134**) und Malonsäure (**135**) die β,γ -ungesättigte und *E*-konfigurierte Carbonsäure **136** dargestellt (Schema 35). Dies erfolgte über eine Kondensationsreaktion in Dimethylsulfoxid (DMSO) bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ unter Verwendung von katalytischen Mengen an Piperidiniumacetat, das *in situ* aus Piperidin und Essigsäure gebildet wurde.

Im Gegensatz zur klassischen Knoevenagel-Kondensation, die unter basischen Bedingungen zu α,β -ungesättigten Carbonsäuren führt, wird bei der modifizierten Variante von Ragoussis unter neutralen Bedingungen eine (*E*)-Alk-3-ensäure erhalten. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind im nachfolgenden Schema 36 gezeigt.



Schema 36: Reaktionsmechanismus zur Bildung einer β,γ -ungesättigten, *E*-konfigurierten Carbonsäure (unten) im Vergleich zur klassischen Knoevenagel-Kondensation (oben) ausgehend von einem Aldehyd und Malonsäure.^[459]

Bei der Knoevenagel-Kondensation wird, die aus Malonsäure und einem Aldehyd erzeugte, Hydroxyzwischenstufe durch die eingesetzte Base (z. B. Pyridin als Lösungsmittel) deprotoniert, sodass über das anionische Intermediat eine Decarboxylierung und Eliminierung von Wasser stattfindet (Schema 36, oben). Dabei entsteht eine (*E*)-Alk-2-ensäure. Findet die Reaktion dagegen unter Rückfluss in DMSO, DMF oder Xylol in Abwesenheit von basischen Komponenten statt, so tritt die simultane Decarboxylierung und Wassereeliminierung nicht auf, da das anionische Intermediat nicht gebildet wird. Stattdessen kommt es zur Piperidiniumacetat-katalysierten Dehydratisierung der Hydroxyzwischenstufe, die zu einer α,β -ungesättigten (a)

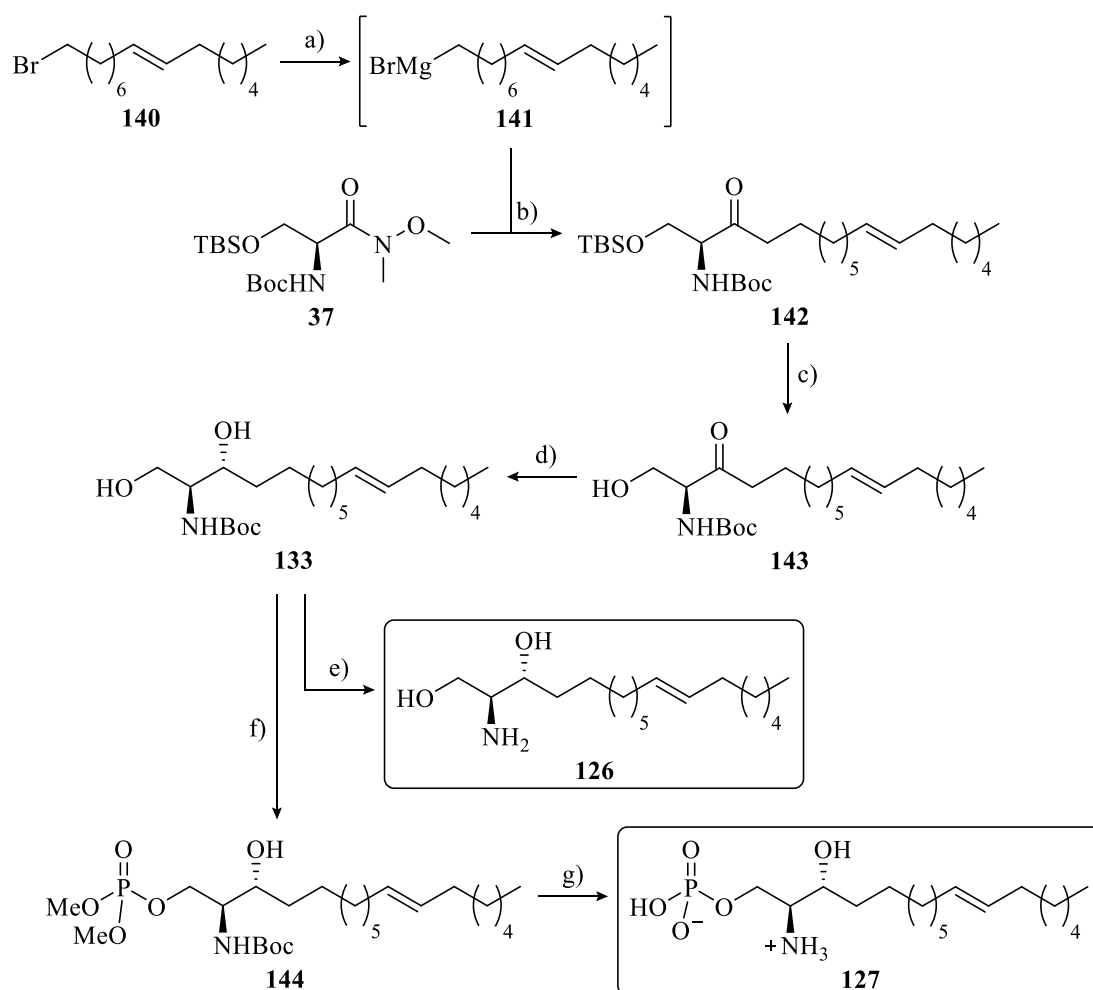
und einer β,γ -ungesättigten Dicarbonsäure (b) führt. Erstere unterliegt bei den gewählten Bedingungen keiner Decarboxylierung, sondern lediglich einem reversiblen Hydratations-Dehydratisierungsprozess. Sobald die β,γ -ungesättigte Dicarbonsäure gebildet wurde, wird diese irreversibel zur (*E*)-Alk-3-ensäure decarboxyliert. Eine *Z*-konfigurierte C-C-Doppelbindung ist aufgrund der ungünstigen Anordnung der sterisch anspruchsvollen Reste (Schema 36, unten, Newman-Projektionen) während des Dehydratisierungsschrittes auszuschließen.^[459]

Die durchgeführte Kondensation von Octanal (**134**) und Malonsäure (**135**) lieferte (*E*)-Dec-3-ensäure (**136**) in quantitativer Ausbeute. Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein und bestätigen die erfolgreiche Synthese von Verbindung **136**, die daraufhin mit einem Äquivalent Lithiumaluminiumhydrid in trockenem Tetrahydrofuran (THF) zum Alkohol **137** reduziert wurde (Schema 35).^[459,460] Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel wurde (*E*)-Dec-3-en-1-ol (**137**) mit einer Ausbeute von 66 % isoliert. Im ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) erscheinen die Signale der olefinischen Protonen bei 5.37 und 5.55 ppm jeweils als charakteristisches Dublett von Triplets von Triplets mit einer gemeinsamen ³*J*-Kopplungskonstante von 15.3 Hz, die auf die *E*-Konfiguration der C-C-Doppelbindung hinweist. Die erhaltenen spektroskopischen Daten für Alkohol **137** stimmen gut mit denen aus der Literatur überein.^[461,462]

Die Hydroxygruppe von **137** wurde im nächsten Schritt über eine Appel-Reaktion mit einem Bromatom substituiert, das nachfolgend die geplante Alkylkettenverlängerung ermöglicht.^[463] Die unter S_N2-Bedingungen ablaufende Bromierung wurde mit Tetrabrommethan und Triphenylphosphan durchgeführt. Nach der vollständigen Umsetzung des Alkohols zum Bromid wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand mit Pentan versetzt. Dabei wurde das bromierte Produkt in Lösung gebracht, während das gebildete Triphenylphosphanoxid größtenteils als unlöslicher Feststoff zurückblieb und durch Filtration abgetrennt werden konnte. Die anschließende Säulenchromatographie lieferte das gewünschte (*E*)-1-Bromdec-3-en (**138**) mit einer exzellenten bzw. nahezu quantitativen Ausbeute von 99 %. Die NMR-Daten bestätigen die erfolgreiche Substitution der Hydroxygruppe. Das Protonensignal der bromgebundenen CH₂-Gruppe erscheint im ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 400 MHz) bei 3.36 ppm als Triplett mit einer Kopplungskonstanten von ³*J*_{1,2} = 7.2 Hz. Die Protonen *H*-1 erfahren somit eine Hochfeldverschiebung von 0.26 ppm im Vergleich zur hydroxylierten Vorstufe. Dies ist auf eine Erhöhung der Elektronendichte an den betrachteten Wasserstoffkernen und deren stärkere Abschirmung zurückzuführen. Wird das *C*-1-gebundene Sauerstoffatom mit einem weniger elektronegativen Bromatom ausgetauscht, so erfährt auch das entsprechende Kohlenstoffsignal eine Hochfeldverschiebung. Ein Vergleich der ¹³C-NMR-Spektren (CDCl₃,

100 MHz) von Alkohol **137** und Bromalken **138** zeigt für das Signal von C-1 einen deutlichen Shift zu niedrigerer chemischer Verschiebung von 62.2 zu 36.2 ppm.

Das bromierte Alken **138** wurde im nächsten Schritt über eine kupferkatalysierte Alkylierungsreaktion der entsprechenden Grignard-Verbindung **139** um fünf Methyleneinheiten zu **140** verlängert (Schema 35). Die Kettenverlängerung wurde analog zur Synthese des bromierten Olefins **86** (Kapitel 4.1.3.4) durchgeführt, wobei 1,5-Dibrompentan als Elektrophil diente. Das langkettige Bromalken **140** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit Cyclohexan als Eluent mit einer Ausbeute von 32 % isoliert. Somit stand der hydrophobe Teil der atypischen Sphingolipide zur Verfügung und ermöglichte die Synthese von (11*E*)-Sphinganin (**126**) und des phosphorylierten Derivats **127** (Schema 37).



Schema 37: Durchgeführte Synthesen der TPA-basierten, atypischen Sphingolipide (11*E*)-Sphinganin (**126**) und (11*E*)-S1P (**127**) ausgehend von Weinreb-Amid **37** und Bromalken **140**. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Mg, Et₂O, RT, 30 min; b) THF, 0 °C→RT, 2 h, 90 %; c) TBAF, THF, 0 °C→RT, 15 min, 75 %; d) LiAl(O*t*Bu)₃H, EtOH, -78 °C, 7 h, 69 %; e) AcCl, MeOH, 0 °C→RT, 3 h, 91 %; f) P(OMe)₃, CBr₄, Pyridin, 0 °C→RT, 3 h, 61 %; g) TMSBr, DCM, 0 °C→RT, 3 h, dann MeOH/H₂O, RT, 1 h, 52 %.

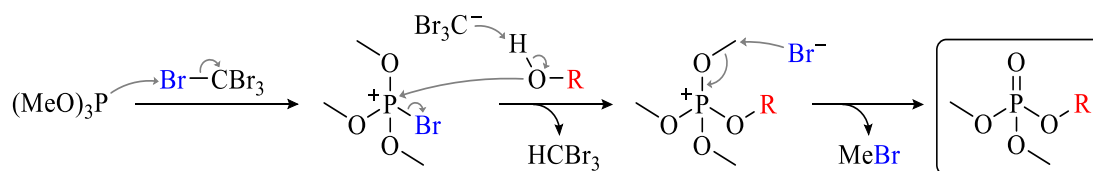
Wie bei den Vorversuchen wurde zunächst die C-C-Knüpfung zwischen Weinreb-Amid **37** und einer Grignard-Verbindung durchgeführt. Der entscheidende Unterschied für die erfolgreiche Synthese der atypischen Sphingolipide war das aus **140** generierte Metallorganyl **141**, durch das die Bildung des C₁₈-Gerüsts mit der *E*-konfigurierten C-C-Doppelbindung an Position 11 in nur einem Schritt stattfand. Das mit 90 % Ausbeute erhaltene Keton **142** wurde daraufhin mit TBAF behandelt, um die Silylschutzgruppe zu entfernen und die Löslichkeit in Ethanol zu erhöhen. Das β -Hydroxyketon **143** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 75 % isoliert. Die stereoselektive Reduktion zum (2*S*,3*R*)-Diol **133** erfolgte analog zu den Vorversuchen und zur Synthese von Allylalkohol **38** (Kapitel 4.1.1) mit dem sterisch anspruchsvollen Reduktionsmittel LiAl(O*t*Bu)₃H in Ethanol bei -78 °C (Schema 37).

Das mit 61 % Ausbeute isolierte *N*-Boc-geschützte (11*E*)-Sphinganinderivat **133** stellt die Vorstufe des atypischen Sphinganins **126** sowie des Sphingosin-1-phosphatderivats **127** dar.

Die Synthese von (11*E*)-Sphinganin (**126**) erfolgte in Anlehnung an die Synthese von ω -Azido-sphinganin (**93**) (Kapitel 4.1.3.6) ausgehend von Carbamat **133** mittels *in situ*-HCl-Generierung durch die Zugabe von Acetylchlorid in Methanol. Das Reaktionsgemisch wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis die DC-Kontrolle den vollständigen Umsatz zeigte. Nach wässrig-basischer Aufarbeitung und der Extraktion mit Dichlormethan wurde das gewünschte TPA-basierte Sphinganinderivat **126** mit einer sehr guten Ausbeute von 91 % erhalten (Schema 37). Eine säulenchromatographische Reinigung war aufgrund der hohen Produktreinheit nicht nötig. Neben den ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopischen Daten bestätigt auch das aufgenommene ESI-Massenspektrum die erfolgreiche Synthese von (11*E*)-Sphinganin (**126**). Die protonierte Spezies [M+H]⁺ wird mit einer Messgenauigkeit von 1.17 ppm bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 300.28936 detektiert (berechnet: m/z 300.28971).

Die Synthese von S1P-Analogen **127** erfolgte in Anlehnung an Blot *et al.* und Szulc *et al.* über eine Phosphorsäureester-Zwischenstufe, die durch selektive Phosphorylierung der primären Hydroxygruppe von *N*-Boc-(11*E*)-Sphinganin (**144**) erhalten wurde.^[464,465] Hierfür wurden zunächst Diol **133** und 1.25 Äquivalente Tetrabrommethan in trockenem Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 1.40 Äquivalenten Trimethylphosphit versetzt. Das Gemisch wurde anschließend drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann wässrig-sauer mit 1 M HCl aufgearbeitet. Nach der Extraktion mit Essigsäureethylester und der säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel wurde Phosphorsäuretriester **144** mit einer Ausbeute von 61 % isoliert (Schema 37).

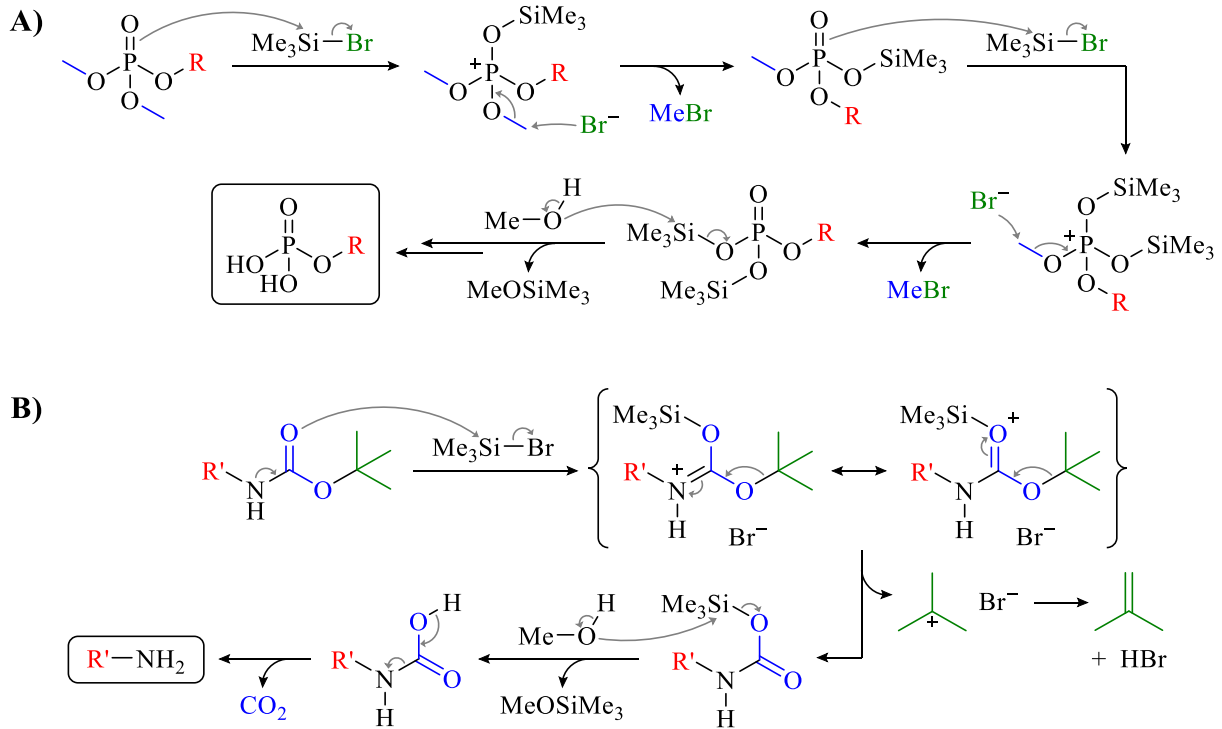
Die 1995 von V. Oza und R. Corcoran vorgestellte milde und selektive Phosphorylierung von Alkoholen mit Trimethylphosphit und Tetrabrommethan in Pyridin läuft über ein intermediäres Alkoxytrimethylphosphoniumsalz ab, bei dem letztlich durch den nukleophilen Angriff von Bromid eine Methylgruppe abgespalten wird (Schema 38). Das Phosphoratom wird ausgehend vom Phosphit (Oxidationsstufe +III) zum Phosphorsäureester (+V) oxidiert.^[466]



Schema 38: Reaktionsmechanismus der *in situ* oxidativen Phosphorylierung eines Alkohols mittels Trimethylphosphit und Tetrabrommethan.^[466]

Neben dem aufgenommenen ESI-Massenspektrum bestätigen auch die NMR-Daten den Erfolg der Synthese des geschützten S1P-Derivats **127**. Im ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz) sind die zwei Dublettsignale bei 3.77 und 3.80 ppm mit einem jeweiligen Integralwert von 3 den Protonen der Methoxygruppen zuzuordnen. Die vicinale Kopplung mit dem Phosphoratom mit Kernspin $\frac{1}{2}$ geht dabei mit einer Konstanten von $^3J_{\text{OMe,P}} = 3.0$ Hz ein. Die Phosphorylierung der primären Hydroxygruppe ist ebenfalls an den Signalen der diastereotopen Protonen an C-1 erkennbar, da diese aufgrund der zusätzlichen Kopplung mit dem Phosphorkern nicht mehr als typische Dublett von Dubletts, sondern als Multipletts bei 4.08–4.14 und 4.39–4.43 ppm, erscheinen. Im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 160 MHz) ist lediglich ein Singulettsignal bei 5.17 ppm zu erkennen, was demonstriert, dass nur eine Phosphorspezies isoliert wurde.

Die finale Abspaltung der Boc- und Methylschutzgruppen von Verbindung **144** erfolgte mit Trimethylsilylbromid in Dichlormethan und der anschließenden Hydrolyse der silylierten Zwischenstufe durch wässriges Methanol. Bei der Phosphorsäureesterspaltung werden über Phosphoniumintermediate die CH_3 -Gruppen unter Freisetzung von Brommethan durch TMS-Gruppen substituiert. Die anschließende Hydrolyse der Silylether liefert dann das gewünschte Phosphat (Schema 39 A).^[467] Aus der Carbamatgruppe wird unter Abspaltung von *iso*-Buten zuerst ein Silylester gebildet, der durch nachfolgende Hydrolyse eine Carbaminsäure freisetzt. Diese zerfällt schließlich in das gewünschte Amin und Kohlenstoffdioxid (Schema 39 B).^[468]



Schema 39: Postulierte Reaktionsmechanismen der Phosphatester- und Carbamatspaltung mit TMSBr.^[467,468]

Die säulenchromatographische Reinigung des gebildeten S1P-Analogons **127** an Kieselgel oder RP18-Kieselgel ist aufgrund des amphiphilen Charakters schwierig. In der Literatur werden für die Reinigung von Sphingosin-1-phosphat und dessen Derivate häufig andere stationäre Phasen wie das polyaromatische Adsorbens Amberlite® XAD4 beschrieben.^[283,329,469,470] Eine weitere gängige Methode zur Reinigung von Lipidphosphaten ist eine Umkristallisation aus THF und Wasser.^[464] Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das atypische S1P-Analogon (**127**) jedoch durch einfaches Waschen mit geringen Mengen an Methanol erfolgreich gereinigt, da die Verunreinigungen eine höhere Löslichkeit in Methanol aufwiesen. Dazu wurde nach dem Hydrolyseschritt das Lösungsmittel bei vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand mit Methanol im Ultraschallbad behandelt. Daraufhin wurde der Feststoff durch Zentrifugation von der Waschlösung getrennt und getrocknet. Das gewünschte (11*E*)-S1P (**127**) wurde ausgehend von Phosphorsäuretriester **144** mit einer Ausbeute von 52 % isoliert (Schema 37).

Die erhaltenen MS- und NMR-Daten bestätigen die Synthese des atypischen Phosphats **127**. Im ESI-Spektrum wird das Natriumaddukt $[M+Na]^+$ mit einer Messgenauigkeit von 1.17 ppm bei m/z 402.23751 detektiert. Das P-Atom führt im ^{13}C -NMR-Spektrum zu einer Dublett-aufspaltung der Signale von C-1 bei 62.6 ppm und C-2 bei 57.6 ppm. Die olefinischen C-Atome (C-11, C-12) resonieren am weitesten tieffeldverschoben bei 131.5 ppm (Abbildung 39).

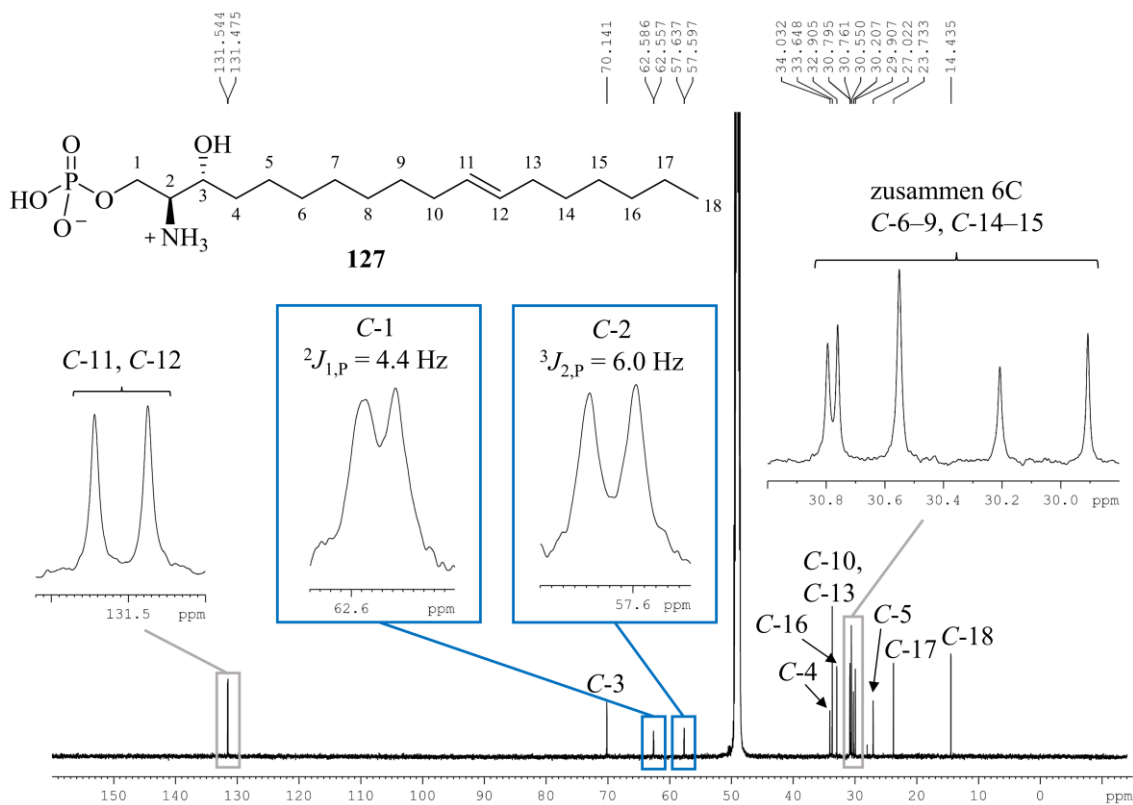


Abbildung 39: ^{13}C -NMR-Spektrum (CD_3OD , 150 MHz) von (11E)-S1P (**127**).

Im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum (CD_3OD , 160 MHz) von **127** ist wie bei der Phosphorsäuretri-estervorstufe **144** ein Singulettsignal zu erkennen, was die Isolierung einer einzigen Phosphorspezies bestätigt. Im ^1H -gekoppelten ^{31}P -NMR-Spektrum ist dagegen eine Signalaufspaltung in ein Dublett von Dubletts zu beobachten, da das P-Atom mit den diastereotopen Protonen $H-1_{a,b}$ über drei Bindungen koppelt. Die Kopplungskonstanten sind dabei gleich groß (Abbildung 40).

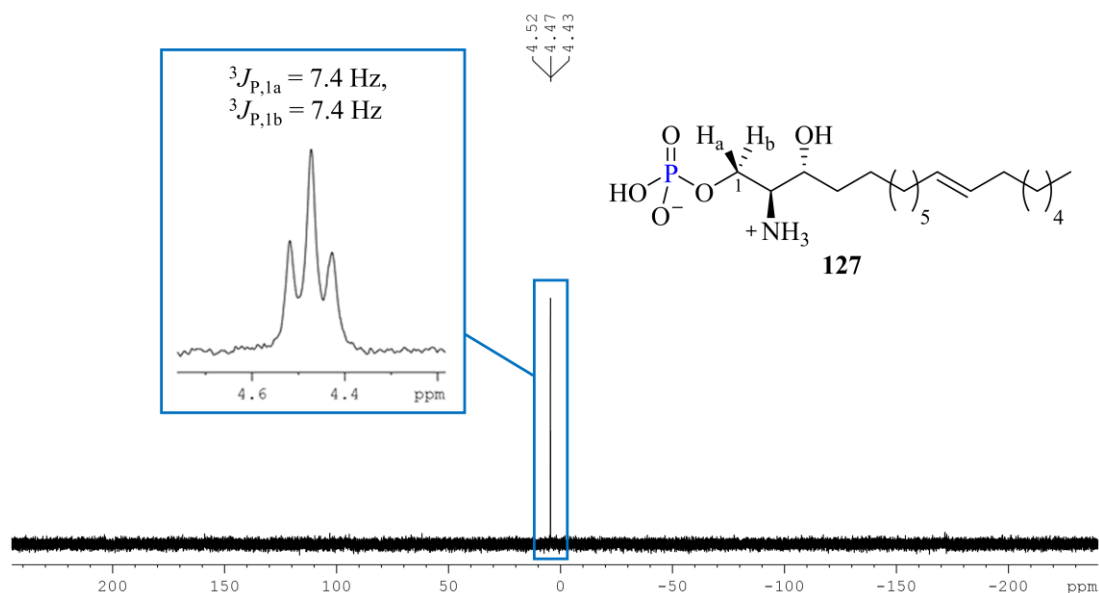


Abbildung 40: ^1H -gekoppeltes ^{31}P -NMR-Spektrum (CD_3OD , 160 MHz) von (11E)-S1P (**127**).

Die beiden synthetisierten atypischen Sphingolipidanaloga **126** und **127** wurden daraufhin von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) als Standardsubstanzen für die Untersuchung des TPA-basierten Sphingolipidmetabolismus eingesetzt. Mit Hilfe des zellfreien mikrosomalen Syntheseassays kombiniert mit LC-MS/MS wurde demonstriert, dass neben Palmitinsäure die ungesättigte Variante TPA (**125**) von SPT, dem ersten Enzym der *de novo*-Sphingolipidbiosynthese, als Substrat akzeptiert und mit L-Serin (**24**) zum entsprechenden 3-Ketosphinganinderivat mit einer *trans*-C-C-Doppelbindung an Position 11 umgesetzt wird. Das nachfolgende Enzym KDSR katalysiert die Umsetzung zum atypischen, ungesättigten (11*E*)-Sphinganin (**126**). Auch CerS ist in der Lage TPA-basierte Dihydroceramidspezies zu generieren. Da im verwendeten *in vitro*-Assay bekannterweise die Ceramidbildung ausgehend von L-Serin (**24**) und Fettsäuresubstraten eingeschränkt ist und eine Limitierung der Methode darstellt, wurde das im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierte (11*E*)-Sphinganin (**126**) als CerS-Substrat im Metabolismusassay eingesetzt.^[109] Dadurch wurde insgesamt die Ceramidbildung erleichtert und die Nachweisbarkeit der atypischen Ceramidspezies erhöht. So wurden schließlich neben TPA-basierten Dihydroceramiden auch Ceramide detektiert (Abbildung 41).

Der *de novo*-Syntheseassay wurde von den Kooperationspartnern zur Kontrolle zusätzlich mit gesättigtem Sphinganin-d₇ durchgeführt. Quantitative Vergleiche zeigen, dass CerS und DEGS nicht zwischen Palmitinsäure- und TPA-basierten Substraten unterscheiden. Im Gegensatz dazu katalysiert das erste Enzym der Biosynthese, SPT, bevorzugt die Umsetzung von Palmitinsäure statt TPA (**125**).

Um die Bildung von TPA-abgeleiteten, atypischen Sphingolipiden in einem Zellsystem nachzuweisen, wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger humane Leber-Tumorzellen mit der *trans*-Fettsäure **125** behandelt und anschließend mittels LC-MS/MS-Sphingolipidomics analysiert. Wie bei dem zuvor durchgeführten *in vitro*-Assay, wurde TPA auch in Zellen zu Sphingolipidspezies verstoffwechselt. Der Gehalt an TPA-basierten Ceramiden ist aufgrund der Selektivität von SPT ungefähr eine Größenordnung niedriger als der Gehalt an Ceramiden, bei denen Palmitinsäure zum Grundgerüstaufbau verwendet wird.

Mit der Referenzsubstanz (11*E*)-Sphinganin (**126**) wurde zum ersten Mal die *de novo*-Synthese von atypischen Sphingolipiden bis zum finalen Ceramid ausgehend von TPA, sowohl *in vitro* mit Rattenlebermikrosomen als auch in kultivierten Hepatozyten, mit Hilfe hochaufgelöster Massenspektrometrie nachgewiesen.

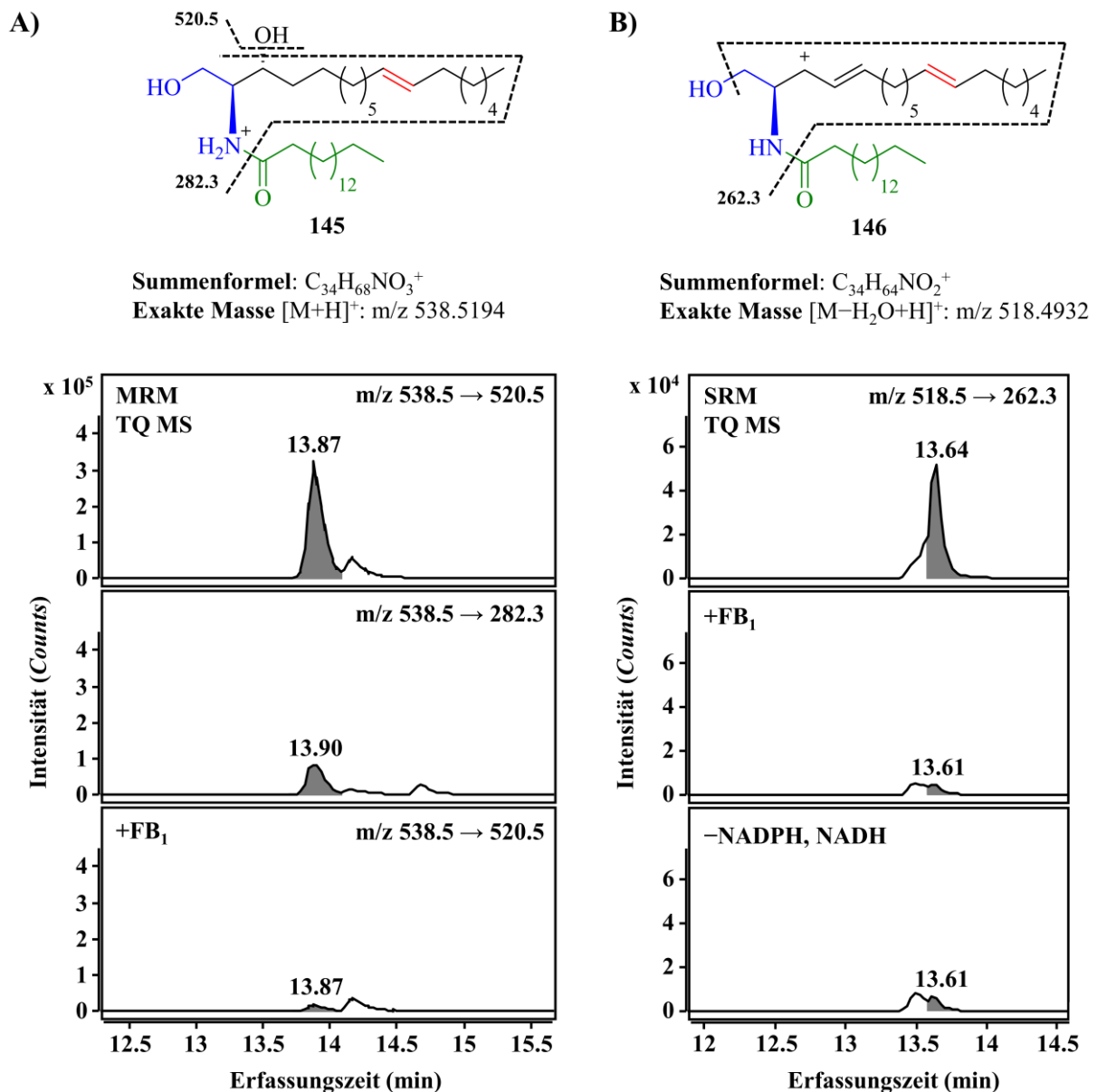


Abbildung 41: A) Detektion des C_{16} -Dihydroceramids **145** durch charakteristische MS/MS-Fragmentierungen. Das Signal bei einer Retentionszeit von 13.9 min verliert bei Zugabe des CerS-Inhibitors FB_1 stark an Intensität. (11*E*)-Sphingandin (**126**) wird also von CerS als Substrat akzeptiert und metabolisiert. B) Detektion des atypischen C_{16} -Ceramids als finales *de novo*-Syntheseprodukt durch eine typische MS/MS-Fragmentierung des Kations **146**. Das Signal bei 13.6 min verliert bei Zugabe von FB_1 und bei Abwesenheit von NADPH /NADH stark an Intensität. Dihydroceramid **145** wird also von DEGS akzeptiert und unter Ausbildung der C-4-C-5-Doppelbindung metabolisiert. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Unveröffentlichte Ergebnisse.

In einem weiteren Projekt der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser sollte aufgeklärt werden, ob (11*E*)-Sphingandin (**126**) von SphK1 als Substrat erkannt und zu S1P-Analogon **127** phosphoryliert wird (Schema 36). Dazu wurden im mikrosomalen *in vitro*-Assay L-Serin (**24**) und TPA (**125**) als Substrate und SphK1 als benötigtes Enzym eingesetzt. Durch Zugabe des

CerS-Inhibitors Fumonisin B₁ (FB₁) wurde die Konkurrenzreaktion des gebildeten atypischen Sphingans zu Dihydroceramid gehemmt. Die Generierung des S1P-Analogons **127** im zellfreien Metabolismusassay wurde massenspektrometrisch mit Hilfe der im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierten Standardsubstanz eindeutig nachgewiesen (Abbildung 42).

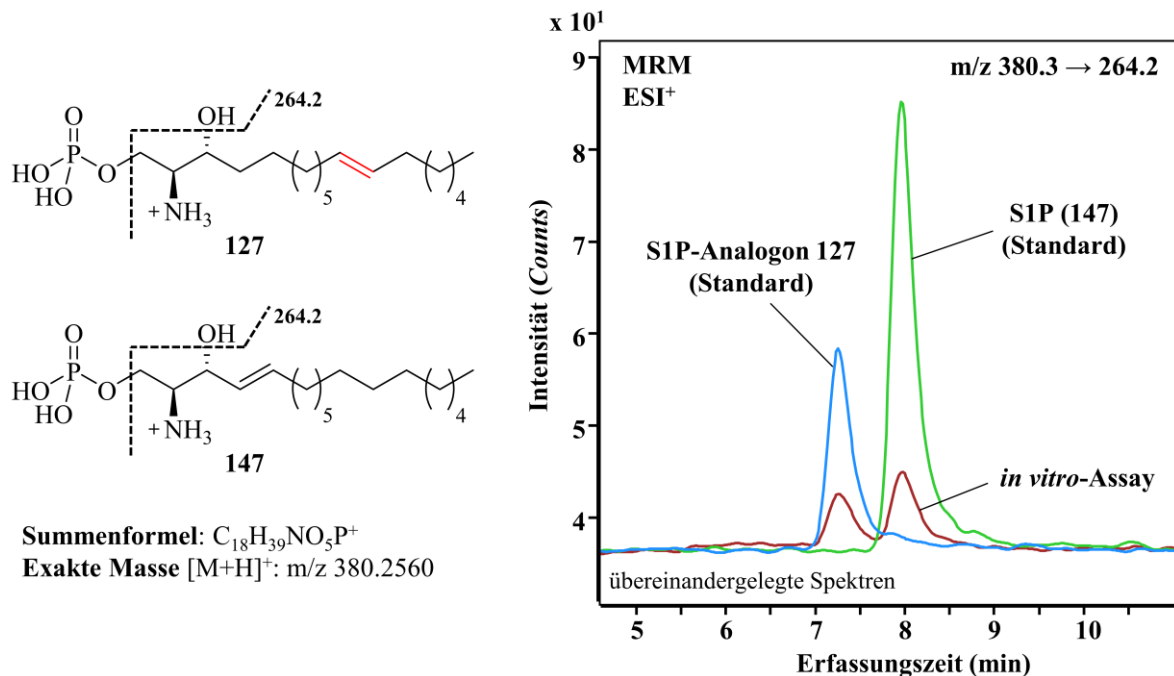


Abbildung 42: Massenspektrometrische Detektion des atypischen S1P-Analogons **127**, das im mikrosomalen Assay zur Simulation der *de novo*-Sphingolipidsynthese ausgehend von L-Serin (**24**) und TPA (**125**) gebildet wird (rotes linkes Signal). Das isomere S1P (**147**) wird ebenfalls detektiert (rechtes rotes Signal), da Palmitinsäure als natürliche Verunreinigung im Mikrosomenansatz auftritt und als Substrat erkannt wird. Die Experimente und Datenauswertung wurden von Dr. Fabian Schumacher und Dominik Wigger (AG Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Freie Universität Berlin, Universität Potsdam) durchgeführt. Unveröffentlichte Ergebnisse.

Darüber hinaus deuten die, von den Kooperationspartnern durchgeführten, LC-MS/MS-Analysen von humanem Blutplasma erstmalig auf die Existenz des atypischen S1P-Derivats **127** in Menschen hin. Dies muss in nachfolgenden Experimenten zusätzlich bestätigt werden, indem andere Sphingolipide, z. B. mit einer *Z*-Doppelbindung an Position 14, als mögliche Gründe einer Fehlinterpretation des detektierten Signals ausgeschlossen werden.^[471]

Zusammenfassend stellen (11*E*)-Sphinganin (**126**) und S1P-Analogon **127** als MS-Standards wertvolle Werkzeuge für nachfolgende Studien dar, bei denen der TPA-basierte Sphingolipid-metabolismus in Bezug zu verschiedenen Krankheiten wie Typ 2-Diabetes untersucht werden soll, um dadurch neue potenzielle therapeutische Targets zu identifizieren. Ob und inwieweit atypische Sphingolipide möglicherweise gesundheitsfördernd sind, muss noch eruiert werden.

5 Zusammenfassung

Die Zelle stellt die kleinste Einheit des Lebens dar und zeichnet sich durch die hoch koordinierte Anordnung von mehreren Millionen (Bio-)Molekülen zu einem Mikrometergroßen Objekt aus. Als struktureller Bestandteil der Lipiddoppelschicht eukaryotischer Zellen spielt neben Sterolen und Glycerolipiden die Verbindungsklasse der Sphingolipide eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Membranintegrität.^[472] Darüber hinaus sind bioaktive Sphingolipide bei vielen grundlegenden zellulären Prozessen wie Apoptose, Wachstum, Differenzierung, Migration und Adhäsion entscheidend beteiligt.^[87,120] Ein gestörtes Gleichgewicht des Sphingolipidmetabolismus und Defekte der entsprechenden Stoffwechselwege stehen im Zusammenhang mit vielen Krankheiten wie Krebs, Diabetes, Adipositas, Arteriosklerose, chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen sowie viraler und bakterieller Pathogenese.^[22,143,473,474]

Die Entwicklung und Anwendung von Sphingolipidanaloga als potenzielle Wirkstoffe rückten in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus der interdisziplinären Forschung von Biologen, Chemikern und Medizinern. Als bekanntestes Beispiel ist Fingolimod (FTY720) zu nennen, das als Sphingosin-1-phosphat-Mimetikum heute unter dem Markennamen Gilenya[®] erfolgreich als Arzneistoff zur Behandlung von Multipler Sklerose eingesetzt wird.^[475] Es besteht jedoch die Gefahr, dass Fingolimod zur Schädigung anderer Zellfunktionen und zu gravierenden Nebeneffekten wie Bradykardie führen kann.^[476] Da Sphingolipide ebenfalls in der Kontrolle von bakteriellen und viralen Infektionen essentiell beteiligt sind, spielen Sphingolipide und deren synthetisch dargestellte Derivate vermehrt eine Rolle in der Wirkstoffentwicklung im Kampf gegen pathogene Krankheitserreger.^[175,477-479] Die Wirkweise von antimikrobiellen Sphingolipiden ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Für eine Weiterentwicklung von bekannten Medikamenten gegen verschiedene Krankheiten oder für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe gegen Erreger ist eine umfassende Untersuchung der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen auf molekularer Ebene entscheidend.

Hierfür finden aufgrund der relativ einfachen Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie häufig fluoreszenzmarkierte Sphingolipidderivate breite Anwendung.^[480] Die kovalent gebundene Farbstoffeinheit bringt jedoch wesentliche Nachteile mit sich, da sich die Biomoleküle durch die veränderte Struktur und Polarität in ihren biologischen Eigenschaften von den natürlichen Substraten unterscheiden können. Die Verwendung von bioorthogonal funktionalisierten Biomolekülen umgeht dieses Problem, da die strukturellen Änderungen minimal gehalten werden.

Nach dem zellulären Einbau dieser Derivate ist eine schnelle und spezifische Konjugation mit einem komplementären Fluorophor zu einem gewünschten Zeitpunkt durch sogenannte Click-Reaktionen wie CuAAC oder SPAAC möglich.^[12,46] Das Prinzip der Click-Chemie wurde bereits auf eine Vielzahl an Biomolekülen wie Sphingolipide, Fettsäuren, Aminosäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Nucleoside oder Nucleinsäuren (DNA und RNA) übertragen.^[47,280] Jedoch bedarf es weiterer spezifisch modifizierter Verbindungen, die vielfältige bioorthogonale Reaktionen für die Untersuchung von Zellprozessen zulassen – sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Um neue Therapieansätze gegen verschiedene Krankheiten zu entwickeln und schwerwiegende Nebenwirkungen zu vermeiden, ist die detaillierte Erforschung hochkomplexer Zellvorgänge auf molekularer Ebene von entscheidender Bedeutung. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Synthese und Charakterisierung von molekularen Werkzeugen, die in Kombination mit verschiedenen aktuellen Mikroskopie- und Massenspektrometriemethoden die Visualisierung und Untersuchung des Sphingolipidmetabolismus und weiterer biologischer Prozesse ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgehend von der Aminosäure L-Serin als chirale Vorstufe verschiedene Sphingolipide und neuartige Derivate synthetisiert. Für den selektiven Aufbau des natürlichen Sphingolipidgrundgerüsts wurde auf bekannte Synthesemethoden zurückgegriffen. So konnte das C₁₈-Rückgrat der Ceramide **4** und **5** sowohl über eine Olefinkreuzmetathese als auch eine Liebeskind-Srogl-Kupplung erfolgreich aufgebaut werden. Die beiden Ceramide wurden in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Dr. Niklas Beyersdorf (JMU Würzburg) und Dr. Sofia Dembski (Fraunhofer-Institut für Silicatforschung ISC Würzburg) für die Herstellung von ceramidhaltigen Liposomen eingesetzt (Abbildung 43). Diese dienten als Modellsysteme von T-Zellmembranen und trugen dazu bei, Aussagen über die Einbaueffizienz von extern zugegebenen Ceramiden bei bestimmten Ceramid-Anfangskonzentrationen zu treffen. Generell stellen die Ceramide **4** und **5**, besonders in Form von Liposomen, hilfreiche Werkzeuge für weitere Untersuchungen biophysikalischer Eigenschaften von Zellmembranen dar.

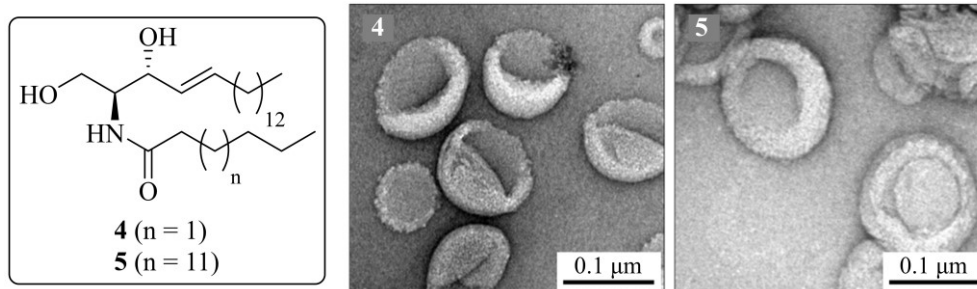


Abbildung 43: Synthetisierte natürliche Sphingolipide C₆-Ceramid (**4**) und C₁₆-Ceramid (**5**), welche für die Herstellung von künstlichen Modellmembranen verwendet wurden (rechts: TEM-Aufnahmen der Liposomen).

Da sich die azidmodifizierten Ceramidderivate **8**, **9** und **11** in vorangegangenen Arbeiten als leistungsstarke Werkzeuge zur Aufklärung biologischer Prozesse bewährten, wurden diese für weitere Projekte synthetisiert (Abbildung 44). Im zuvor erwähnten Liposomen-Projekt wurde der Einbau von den ω -N₃-Ceramiden **8** und **9** in die Modelldoppelmembranen bei unterschiedlichen Ceramid-Anfangskonzentrationen mittels LC-MS/MS und UV/Vis-Spektroskopie nach der SPAAC-Reaktion mit einem DIBO-modifizierten Fluorophor quantitativ untersucht. Es wurde gezeigt, dass ein höherer Ceramid-Anfangsgehalt zu einem verstärkten Einbau der clickbaren Ceramide führt. Dies stützt die Annahme, dass regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) von Mäusen einen höheren Ceramidgehalt in der Plasmamembran aufweisen als konventionelle T-Zellen (T_{Konv}).

In einem weiteren Projekt der Forschungsgruppe von Dr. Niklas Beyersdorf (JMU Würzburg) wurde ω -N₃-C₆-Cer (**8**) eingesetzt, um die Inkorporation von C₆-Ceramid in humane T-Zell-Subtypen zu untersuchen. Die Quantifizierung wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) nach der Click-Reaktion mit einem DIBO-modifizierten Fluorophor durchgeführt. In der klinischen Studie von Wiese *et al.* wurde gezeigt, dass ASM-inhibierende Antidepressiva in Patienten mit Major Depression einen stärkeren relativen Anstieg von T_{Reg} im humanen peripheren Blut induzieren als nicht oder schwach hemmende Antidepressiva.^[366] Eine gezielte Erhöhung der T_{Reg}-Konzentration durch ASM-Inhibitoren könnte künftig bei der Behandlung von Patienten mit Autoimmunerkrankungen genutzt werden.

Das langkettige ω -N₃-C₁₆-Cer (**9**) wurde in einem Projekt der Gruppe von Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies (JMU Würzburg) erstmals für die Untersuchung der Ceramidlokalisation in dendritischen Zellen nach einer Masernvirusinfektion eingesetzt. Nach dem Pathogenkontakt wurde eine erhöhte endozytische Aktivität der Zellen beobachtet (Abbildung 44).

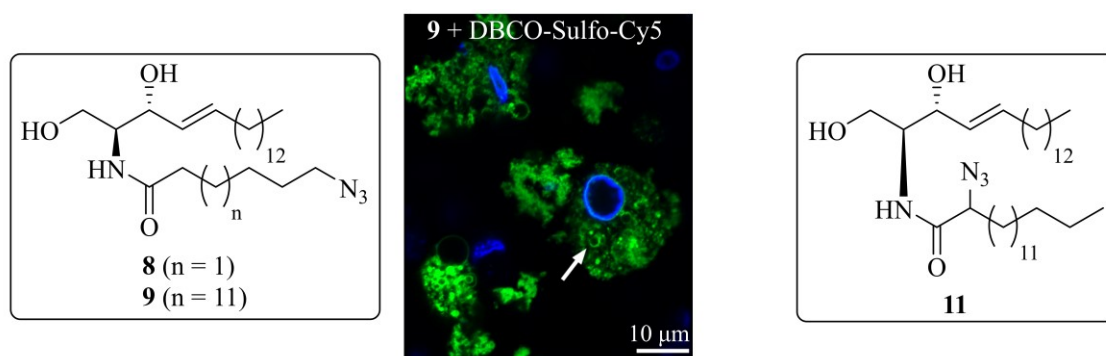


Abbildung 44: Synthetisierte azidfunktionalisierte Ceramidderivate, die sich für bioorthogonale Click-Reaktionen mit Alkinen eignen. Die Visualisierung von ω -N₃-C₁₆-Cer (**9**) in dendritischen Zellen nach einer Masernvirusinfektion soll dazu beitragen physiologische Effekte von Lipiddynamiken bei der Immunreaktion zu verstehen.

In Kombination mit alkinmodifizierten photoschaltbaren Farbstoffen eignen sich die azid-funktionalisierten Ceramidderivate für hochauflösende Fluoreszenzmikroskopieverfahren wie *d*STORM. Da diese Techniken der Hochauflösung eine umfassende Ausrüstung erfordern und meist auf spezialisierte Labore beschränkt sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ceramid-analogon synthetisiert, das sich für die Expansionsmikroskopie (ExM) eignet. Dadurch sind hochauflösende Fluoreszenzaufnahmen unterhalb des Abbe-Limits mit einfacher Lichtmikroskopie möglich. Das ExM-kompatible α -NH₂- ω -N₃-C₆-Ceramid (**74**), welches ausgehend von geschützten L-Lysinderivaten und Sphingosin erfolgreich dargestellt wurde, besitzt neben der Azidfunktion für die Konjugation mit einem Fluorophor eine primäre Aminogruppe für die Verankerung im schwellbaren Hydrogel. Letzteres beruht auf der kovalenten Verknüpfung über das Glutaraldehyd (GA)-Netzwerk, das bei der Zellfixierung gebildet wird (Abbildung 45 A). Die Gruppen von Prof. Dr. Markus Sauer und Dr. Vera Kozjak-Pavlovic (JMU Würzburg) zeigten, dass das Ceramidderivat **74** nach der Zellfixierung nur begrenzt durch Detergenzien ausgewaschen wird (Abbildung 45 B). Durch Sphingolipid-ExM wurde in diesem Projekt erstmalig die innere und äußere Membran von Bakterien in humanen Zellen nach 10-facher Expansion mit einer räumlichen Auflösung von 10–20 nm abgebildet (Abbildung 45 C).^[388]

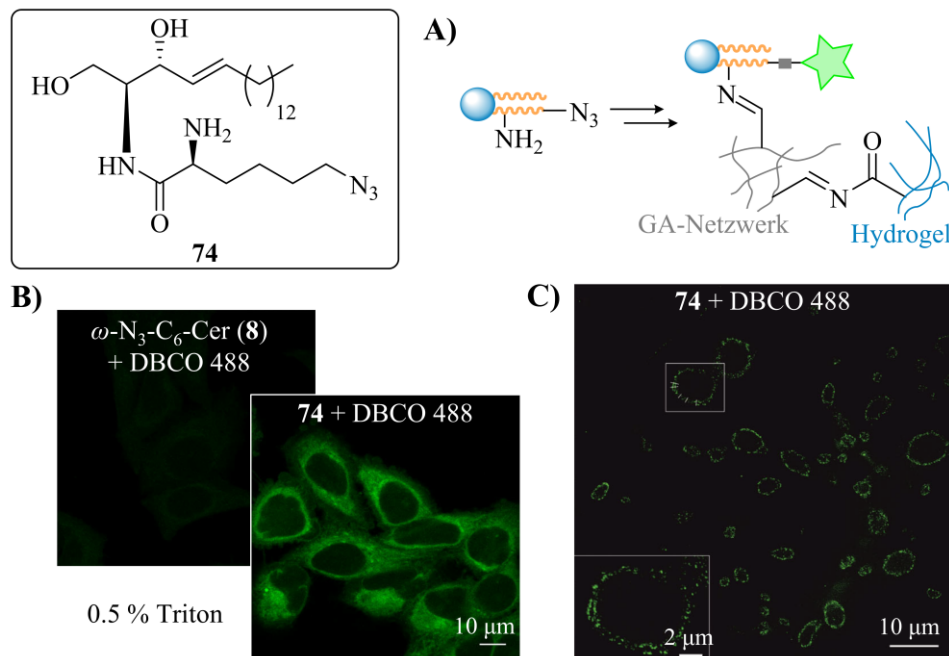


Abbildung 45: Für die Expansionsmikroskopie synthetisiertes α -NH₂- ω -N₃-C₆-Ceramid (**74**), das durch Glutaraldehyd in zelluläre Membranen und im schwellbaren Hydrogel verankert wird (A). Die Verknüpfung mit dem GA-Netzwerk verhindert das Auswaschen des Lipids aus fixierten HeLa229-Zellen durch Tenside (B). Durch die Fixierung im Hydrogel ist eine 10-fache Expansion der Probe möglich, sodass die innere und äußere Membran von intrazellulären Bakterien (*C. trachomatis*) mittels Beleuchtungsmikroskopie hochaufgelöst dargestellt und unterschieden werden kann (C).^[388]

Die Ergebnisse demonstrieren, dass das molekulare Werkzeug Amino(azido)ceramid **74** für die hochauflösende Bildgebung von Zellmembranen und in Kombination mit der Antikörperbasierten Immunmarkierung zur Visualisierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Ceramiden in 4- und 10-fach expandierten Proben geeignet ist. Außerdem ist es möglich bakterielle Krankheitserreger in infizierten Zellen in einer räumlichen Auflösung darzustellen, die vorher nur mit der Elektronenmikroskopie erreicht wurde. Das neu entwickelte auf **74** basierende Sphingolipid-ExM-Verfahren ist somit für detaillierte Studien von bakteriellen Infektionsmechanismen und für die Entwicklung von Antibiotika mit verbesserter Membranpermeabilität von großem Nutzen.^[388]

Neben Ceramidderivaten mit Azidfunktion wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei cyclooctenmodifizierte Ceramidanaloga synthetisiert, die mit Tetrazinfluorophoren eine extrem schnelle bioorthogonale Konjugation durch iEDDA ermöglichen sollen. Bei der Synthese der cyclooctenmodifizierten C₆- und C₁₆-Carbonsäuren ausgehend von einem TCO-haltigen Aktivester erfolgte teilweise eine Isomerisierung zu den Z-Konformeren. Nach der Amidkupplung mit Sphingosin wurden die cyclooctenfunktionalisierten C₆- und C₁₆-Ceramidderivate **81** und **84** als E/Z-Isomerengemische isoliert (Abbildung 46).

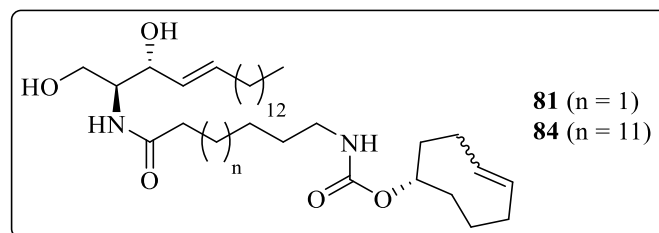


Abbildung 46: Synthetisierte cyclooctenmodifizierte Ceramidderivate, welche durch iEDDA mit geeigneten Tetrazinfarbstoffen die Visualisierung von Sphingolipiddynamiken in lebenden Zellen ermöglichen sollen.

In nachfolgenden Experimenten der Gruppe von Prof. Dr. Markus Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) werden die Cyclooctenylceramidderivate **81** und **84** in Kombination mit geeigneten Tetrazinfarbstoffen für die Untersuchung von Sphingolipiddynamiken *in vivo* mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Der größte Vorteil der fluorogenen Tetrazinfarbstoffe ist ihr „turn-on“-Effekt, der nach der Click-Reaktion zu einer Steigerung der Fluoreszenz und somit zu einem höheren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führt. Dadurch werden selbst mit sehr geringen Substanzmengen kontrastreiche Bilder mit niedriger Hintergrundfluoreszenz ohne weitere Waschprozesse erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben Ceramidderivaten mit funktionalisierten *N*-acylierten Seitenketten auch bioorthogonal modifizierte Sphingoidbasen synthetisiert. Die Darstellung von ω -N₃-Sphingosin (**47**), über eine Olefinkreuzmetathesereaktion als Schlüsselschritt zum Aufbau des C₁₈-Gerüsts, erfolgte in Anlehnung an eine vorangegangene Masterarbeit und trug entscheidend zum Erfolg verschiedener interdisziplinärer Projekte bei.^[282]

Die Gruppe von Prof. Dr. Karl S. Lang (Uni Duisburg-Essen) setzte das azidfunkionalisierte Sphingosinderivat **47** zur Untersuchung der antiviralen Eigenschaft von Makrophagen ein. Die durchgeführte Studie zeigt, dass die Zellinfektion mit Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) durch die Bindung von sphingosinreichen intraluminalen Vesikeln (ILVs) an die Viruspartikel in multivesikulären Körperchen (MVBs) verhindert wird. Für den Nachweis der Sphingosin-Virus-Interaktion wurde das clickbare Analogon **47** in Kollisionsexperimenten genutzt (Abbildung 47 A).^[406] Der beobachtete Zusammenhang zwischen einer gezielten Erhöhung des Sphingosingehalts und einer Hemmung der HSV-1-Vermehrung soll die Entwicklung neuer Therapeutika gegen virale Infektionen auf Basis des Sphingolipidmetabolismus ermöglichen.

In einem weiteren Kooperationsprojekt mit der Gruppe von Prof. Dr. Thomas Rudel (JMU Würzburg) wurde mit Hilfe von ω -N₃-Sphingosin (**47**) der Einfluss von antibakteriellem Sphingosin auf das Wachstum von intrazellulären Gonokokken untersucht. Das Sphingosin-analogon **47** wurde von *Neisseria gonorrhoeae* effizient aus den humanen Wirtszellen aufgenommen und spezifisch in ihre Membranen eingebaut (Abbildung 47 B). Die Studie liefert erstmals Beweise für eine Assoziation von Sphingosin mit intrazellulären Bakterienmembranen und Hinweise darauf, dass der Einbau von Sphingosin in die Neisserienmembran zum Tod der Bakterien führt.^[408] Die Gruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Uni Berlin und Potsdam) demonstrierte außerdem mittels Massenspektrometrie, dass sich ω -N₃-Sphingosin (**47**) physiologisch wie das natürliche Substrat verhält und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von Sphingosinkinase 1 (SphK1) phosphoryliert wird.

Mit der Unterstützung der Gruppen von Prof. Dr. Markus Sauer und Dr. Vera Kozjak-Pavlovic (JMU Würzburg) wurde ω -N₃-Sphingosin (**47**) in Expansionsmikroskopie-Experimenten eingesetzt, wodurch hochauflösende Aufnahmen des Sphingosineinbaus in die intrazellulären Neisserien erhalten wurden (Abbildung 47 C).^[388] Das azidmodifizierte Sphingosinderivat **47** stellt, wie auch das Amino(azido)ceramid **74**, mit der freien Aminogruppe ein leistungsfähiges Werkzeug für die detaillierte Abbildung intrazellulärer Bakterienmembranen durch die neuartige Sphingolipid-ExM dar. Dies fördert weitere Untersuchungen von Pathogen-Wirt-Wechselwirkungen und die Entwicklung neuer Antibiotika gegen multiresistente Keime.

In einem anderen Projekt der Gruppe von Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir (JMU Würzburg) wurde ω -N₃-Sphingosin (**47**) in Kombination mit Licht- und Elektronenmikroskopie für die Untersuchung des Wirkmechanismus von antibakteriellen Sphingolipiden gegen den mikrobiellen Erreger *Neisseria meningitidis* eingesetzt (Abbildung 47 D). Es wurde gezeigt, dass ω -N₃-Sphingosin (**47**) eine konzentrationsabhängige Membranveränderung und -störung der Bakterien induziert. Bei einem Zehntel der minimalen bakteriziden Konzentration (MBC) wurden Zellen mit intaktem intrazellulärem Inhalt, jedoch mit Ausstülpungen und Dehnung der äußeren Membran beobachtet. Die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM), bei der Azid **47** über SPAAC fluoreszenzmarkiert wurde, sowie die HPLC-MS/MS-Analyse der Membranfraktionen bestätigten den Einbau des Sphingosinderivats in die äußere Membran der Bakterien.^[411] Diese Ergebnisse demonstrieren den primären Effekt von Sphingosin auf die äußere bakterielle Membran und liefern weitere Einblicke in den Wirkmechanismus von antibakteriellen Sphingolipiden.

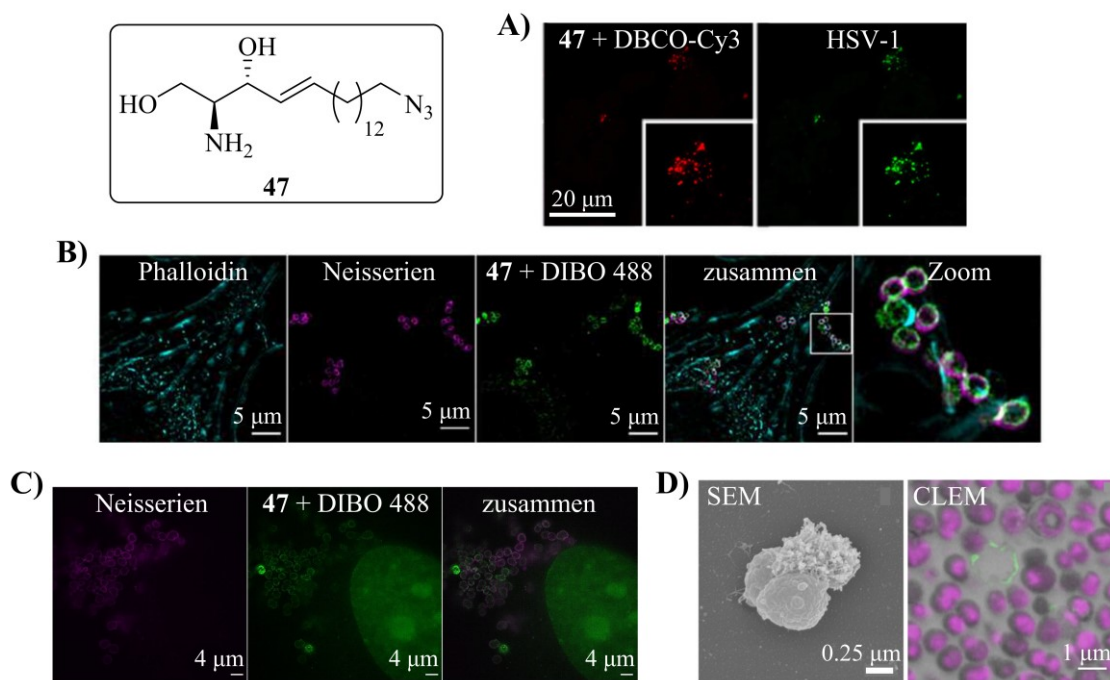


Abbildung 47: Synthetisiertes ω -N₃-Sphingosin (**47**), das in vielfältigen biologischen Systemen über SPAAC mit alkinfunktionalisierten Fluorophoren visualisiert wurde. A) Colokalisation von **47** und HSV-1 in Makrophagen zeigt eine Virus-Sphingosin-Interaktion, die zur Hemmung der Virusvermehrung führt.^[406] B) Hinweise zur antibakteriellen Wirkung von Sphingosin durch Aufnahme und Einbau von **47** in die Membran von *N. gonorrhoeae* in infizierten Chang-Zellen.^[408] C) Visualisierung von **47** in intrazellulären Neisserienmembranen mit höherer räumlicher Auflösung durch Expansionsmikroskopie (4-fache Vergrößerung).^[388] D) Elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchung der bakteriziden Wirkung von **47** gegenüber *N. meningitidis*.^[411]

Ausgehend von ω -N₃-Sphingosin (**47**) wurden verschiedene Ceramidderivate synthetisiert, bei denen die Umsetzung durch Ceramidasen zu keinem Verlust der Sphingolipidmarkierung führt. Die ω -N₃-Ceramide **90**, **91** und **92** (Abbildung 48) werden in weiterführenden Experimenten hinsichtlich ihrer potenziellen antibakteriellen Wirkung untersucht und für Click-Reaktionen in lebenden Zellen sowie als Standardsubstanzen für MS-basierte Metabolismusassays eingesetzt.

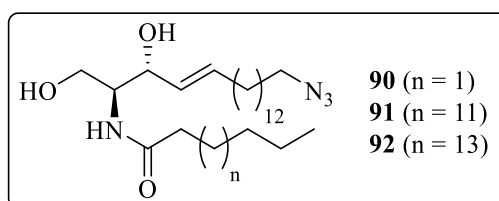


Abbildung 48: Ceramidderivate mit azidfunktionalisiertem Sphingolipidgrundgerüst, die ausgehend von ω -N₃-Sphingosin (**47**) synthetisiert wurden und für die Evaluierung von Lipiddynamiken *in vivo* geeignet sind.

Das Prinzip der bioorthogonalen Markierung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Sphingamin, einer wichtigen metabolischen Vorstufe komplexer Sphingolipide, übertragen. In Anlehnung an die Syntheseroute von ω -N₃-Sphingosin (**47**) wurde ω -N₃-Sphingamin (**93**) über eine Olefin-kreuzmetathesereaktion als Schlüsselschritt zum Aufbau des C₁₈-Gerüsts erhalten. Das azidmodifizierte Sphingaminanalogon **93** wurde in Kooperation mit den Gruppen von Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Uni Berlin und Potsdam) und Prof. Dr. Markus Sauer (JMU Würzburg) für die Entwicklung einer allgemeinen Methode zur Untersuchung der *de novo*-Sphingolipidbiosynthese eingesetzt.^[422] Im mikrosomalen *in vitro*-Assay wurde ω -N₃-Sphingamin (**93**) als Substrat von Ceramidsynthasen (CerS) zur azidmodifizierten Dihydroceramidspezies umgesetzt. Diese wurde von Dihydroceramiddehydratase (DEGS) akzeptiert und zum finalen Azidoceramid **107** metabolisiert (Abbildung 49 A). Die massenspektrometrischen Analysen zeigten außerdem, dass die Phosphorylierung von ω -N₃-Sphingamin (**93**) durch SphK1 katalysiert wird.

Um Aussagen treffen zu können, wie sich die Click-Reaktion mit einem Fluorophor auf die Akzeptanz der sphingolipidmetabolisierenden Enzyme auswirkt, wurde Azid **93** zunächst mit einem DBCO-modifizierten BODIPY-Farbstoff (**110**) über SPAAC konjugiert und das Triazolrohprodukt als Substrat im *in vitro*-Syntheseassay eingesetzt. Die Analyse mittels LC-MS(/MS) demonstrierte, dass das BODIPY-Sphingamin-Konjugat **111** trotz veränderter Molekülgröße und Polarität bis hin zur finalen Ceramidspezies **113** metabolisiert wird (Abbildung 49 A). In diesem Projekt wurde zum ersten Mal die enzymatische Umsetzung eines fluorophormarkierten Sphingaminderivats mit einem Molekulargewicht von über 1140 g·mol⁻¹ und die Detektion der entsprechenden Metaboliten durch LC-MS(/MS) durchgeführt.^[422] Die Verwendung des Click-

Rohprodukts ermöglicht im Allgemeinen eine schnelle und qualitative Aussage darüber, ob der Sphingolipidmetabolismus bei Zellexperimenten nach der Konjugation weiterhin stattfinden kann. Insgesamt stellt ω -N₃-Sphinganin (**93**) eine wertvolle Verbindung für die Untersuchung der *Downstream*-Metaboliten von Sphinganin und des komplexen Sphingolipidmetabolismus dar, was die Entwicklung von neuen Sphingolipid-basierten Therapeutika unterstützt.

Durch Markierungsexperimente in lebenden Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch gezeigt, dass ω -N₃-Sphinganin (**93**) hauptsächlich in Tubuli des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist und somit natives Sphinganin imitiert. In den getesteten Zelllinien (U2OS, COS7) war das Fluoreszenzsignal nach der Click-Reaktion mit DBCO-BODIPY **110** *in vivo* sehr robust und intensiv, sodass es sich bei Azidosphinganin **93** um ein neuartiges molekulares Werkzeug zur effizienten Markierung der ER-Membran handelt (Abbildung 49 B).^[422]

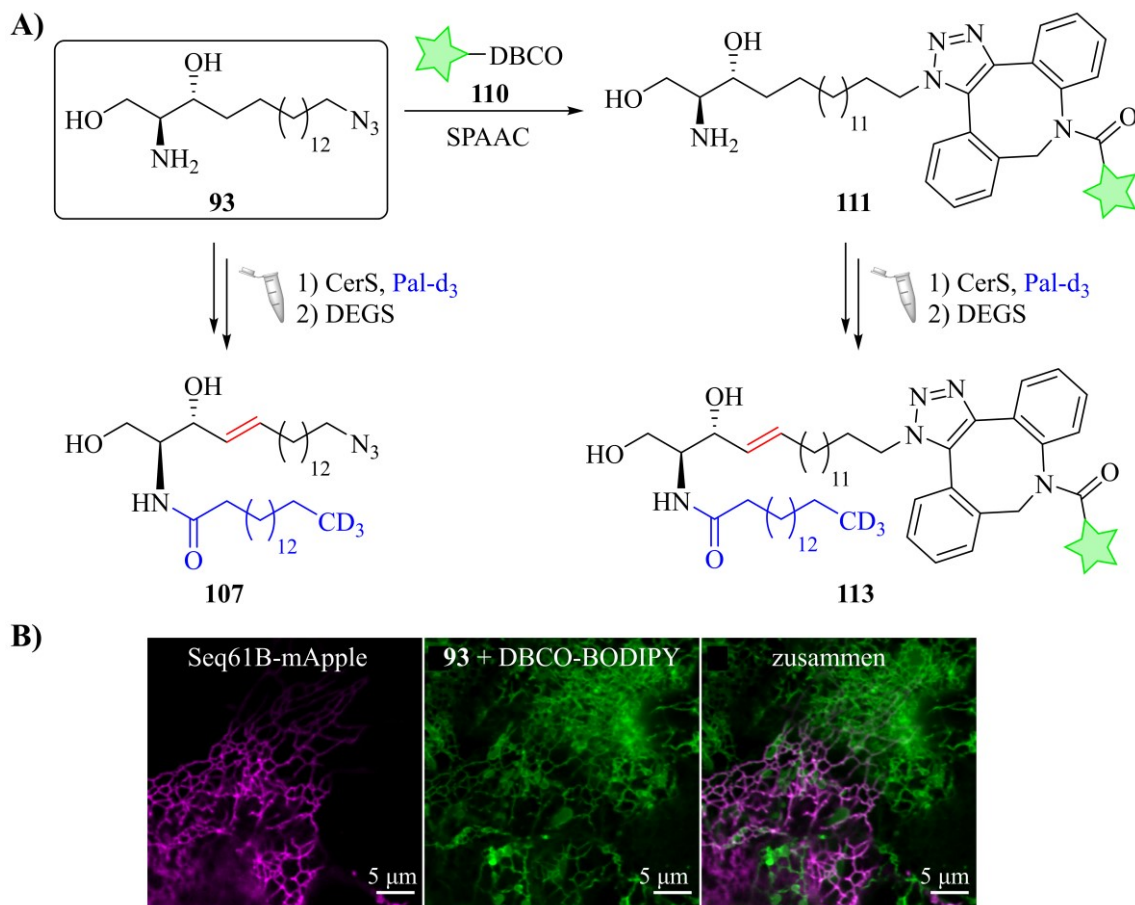


Abbildung 49: Synthetisiertes ω -N₃-Sphinganin (**93**), das in Kombination mit LC-MS(/MS) und Fluoreszenzmikroskopie als Werkzeug zur Aufklärung der *de novo*-Biosynthese von Sphingolipiden eingesetzt wurde. A) Im mikrosomalen *in vitro*-Assay wird **93** als Substrat erkannt und bis zur Ceramidspezies **107** metabolisiert. Nach der Click-Reaktion mit DBCO-BODIPY **110** wird das Konjugat **111** ebenfalls bis zur finalen Ceramidstufe **113** umgesetzt. B) Colokalisation von ER-Marker und Sphinganinderivat **93** in ER-Tubuli von lebenden COS7-Zellen bestätigt, dass sich das clickbare Analogon physiologisch wie natives Sphinganin verhält.^[422]

Zudem eignet sich Verbindung **93** als metabolischer Gb3-Vorläufer, wie von den Gruppen von Prof. Dr. Nurcan Üçeyler (Uniklinik Würzburg) und Prof. Dr. Markus Sauer (JMU Würzburg) demonstriert wurde. Morphologische Analysen lebender Nervenzellen einer gesunden Person und eines Fabry-Patienten deuten auf eine periphere Denervierung durch Gb3-Akkumulation, gestörte lysosomale Integrität und Mitochondrienbeeinträchtigung hin (Abbildung 50).

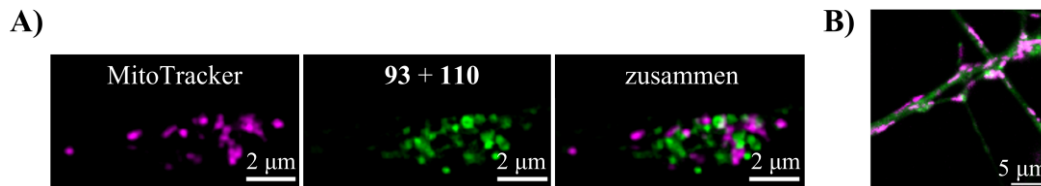


Abbildung 50: A) Synthetisiertes ω -N₃-Sphinganin (**93**) führt nach dem Einbau in Neuronen zur Fragmentierung und Schrumpfung der Mitochondrien. B) Colokalisation von Mitochondrien-Marker und **93** in FD-1-Neuronen zeigt mögliche mitochondriale Blockade durch Sphinganin- bzw. Gb3-Ansammlung.

Neben ω -N₃-Sphingoidbasen, deren Phosphorylierung der primären Hydroxyfunktion durch SphK1 katalysiert wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit 1-N₃-Sphingoidbasen synthetisiert, bei denen diese Kinase-katalysierte Umsetzung gezielt verhindert wird (Abbildung 51).

Im zuvor erwähnten Projekt der Gruppe von Prof. Dr. Thomas Rudel (JMU Würzburg) zeigte 1-N₃-Sphingosin (**123**) im Vergleich zu ω -N₃-Sphingosin (**47**) eine stärkere toxische Wirkung gegen intrazelluläre Gonokokken (Abbildung 51). Der Austausch der Hydroxygruppe mit einer Azidfunktion führt dazu, dass die Metabolisierung zum S1P-Derivat gehemmt wird und dadurch die Konzentration an antibakteriellem Sphingosin(derivat) erhöht bleibt.^[408]

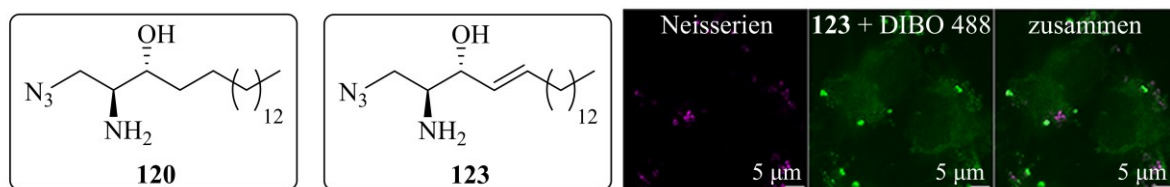


Abbildung 51: Synthetisiertes 1-N₃-Sphinganin (**120**) und 1-N₃-Sphingosin (**123**), bei denen die Kinase-katalysierte Phosphorylierung der Kopfgruppe nicht möglich ist. Folglich zeigt **123** in infizierten Chang-Zellen eine starke antibakterielle Wirkung gegen *N. gonorrhoeae*.^[408]

Die beiden 1-N₃-Sphingolipide **120** und **123** sowie deren Click-Konjugate mit verschiedenen Alkinen stellen potenzielle SphK1-Inhibitoren und somit interessante tumorsuppressive Wirkstoffkandidaten gegen Krebs dar. Des Weiteren wurden ausgehend von **120** und **123** bereits potenzielle Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase (ASM) synthetisiert, die ebenfalls gegen verschiedene Krankheiten wie Krebs oder Depressionen eingesetzt werden könnten.^[317]

Eine weitere Krankheit, die im Zusammenhang mit bioaktiven Sphingolipiden wie Ceramid und S1P steht, ist Typ 2-Diabetes (T2D). Bemerkenswerterweise verringert die Aufnahme von *trans*-Palmitinsäure (TPA) das Entwicklungsrisiko von T2D, jedoch ist der genaue gesundheitsfördernde Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt. Die Untersuchung der Stoffwechselwege ausgehend von TPA mittels Massenspektrometrie ist somit von großem medizinischem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die von TPA abgeleiteten Sphingolipide (11*E*)-Sphingarin (**126**) und S1P-Analogon **127** als Massenspektrometrie-Standards synthetisiert (Abbildung 52 A). Die Gruppe von Prof. Dr. Burkhard Kleuser (Uni Berlin und Potsdam) konnte unter Verwendung der Referenzsubstanz (11*E*)-Sphingarin (**126**) zum ersten Mal die *de novo*-Biosynthese von atypischen Sphingolipiden bis zur finalen Ceramidspezies ausgehend von TPA mittels hochauflösender Massenspektrometrie nachweisen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Abbildung 52 A).

Die SphK1-katalysierte Phosphorylierung von **126** zu **127** wurde ebenfalls unter Verwendung der synthetisierten Standardsubstanzen eindeutig nachgewiesen (Abbildung 52 B). Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei MS-Referenzverbindungen synthetisiert, die in nachfolgenden TPA-Metabolismusstudien die Identifikation neuer therapeutischer Ziele ermöglichen.

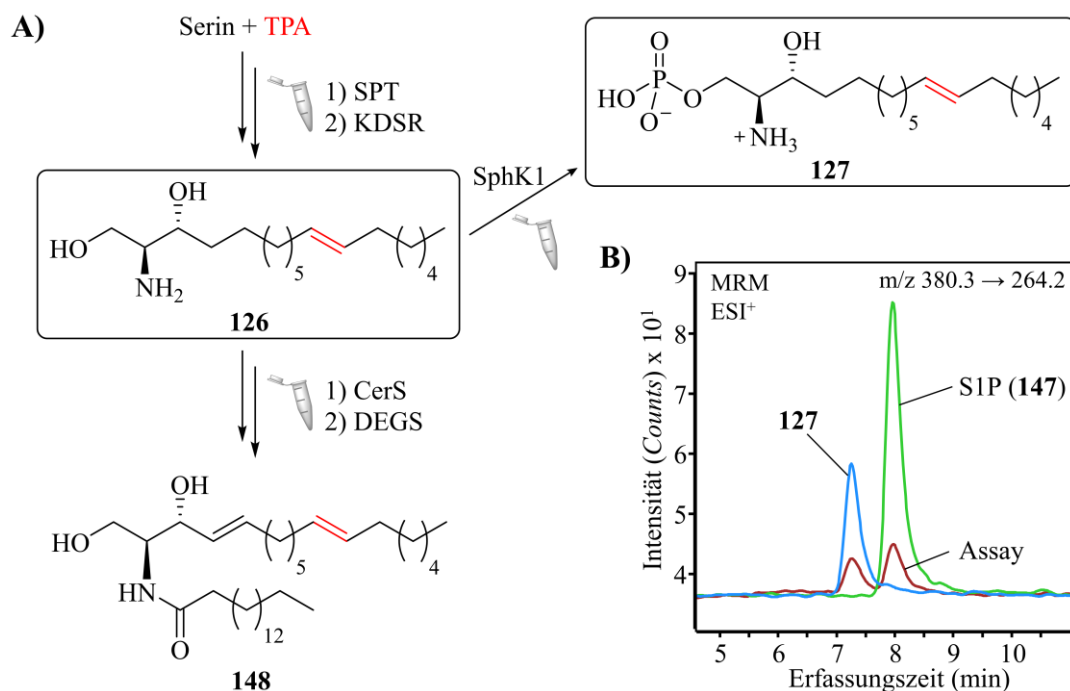


Abbildung 52: A) Synthetisiertes atypisches (11*E*)-Sphingarin (**126**) und die phosphorylierte Spezies **127**, die als MS-Standardsubstanzen zum Nachweis von TPA-abgeleiteten Sphingolipiden eingesetzt wurden. Im zellfreien *de novo*-Syntheseassay wird **126** gebildet und bis zur finalen atypischen Ceramidspezies **148** metabolisiert. B) Die SphK1-katalysierte Bildung von (11*E*)-S1P (**127**) wurde mittels LC-MS/MS bestätigt.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine Vielzahl an Sphingolipiden und deren bioorthogonal funktionalisierte Analoga ausgehend von der Aminosäure L-Serin erfolgreich synthetisiert. Die vorgestellten Verbindungen eignen sich in Kombination mit Massenspektrometrie und Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskopie als molekulare Werkzeuge zur Untersuchung des komplexen Sphingolipidmetabolismus sowie des Einbaus und der Dynamik von Sphingolipiden in Modell- und Zellmembranen. Sowohl in humanen und tierischen Zellen als auch in Bakterien wurden die azidmodifizierten Sphingolipide durch Click-Reaktionen visualisiert, um ein verbessertes Verständnis von bakteriellen und viralen Infektionsprozessen zu erhalten. Der modulare Ansatz der Click-Chemie ermöglicht die Verwendung verschiedener komplementär funktionalisierter Farbstoffe, die unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der Membrandurchgängigkeit oder Absorptions- und Emissionswellenlängen besitzen und somit je nach biologischer Fragestellung gezielt eingesetzt werden können.

Die synthetisierten azidfunktionalisierten Sphingolipidanaloga stellen außerdem Vorstufen für potenzielle Inhibitoren von sphingolipidmetabolisierenden Enzymen dar, was von großem medizinischem Interesse ist. Durch die Konjugation mit verschiedenen Alkinen kann in kurzer Zeit eine umfassende Bibliothek an Wirkstoffkandidaten zur Behandlung unterschiedlicher Krankheiten erzeugt werden. Des Weiteren ermöglicht die Flexibilität der Click-Chemie eine Steigerung und Optimierung der bakteriziden Eigenschaften der erhaltenen Sphingolipid-derivate und bringt dadurch die Entwicklung von neuartigen sphingolipidbasierten Antibiotika voran. Eine andere Anwendungsmöglichkeit der bioorthogonal modifizierten Sphingolipide ist deren kovalente Verknüpfung an die Polymeroberfläche von Beatmungsschläuchen, sodass die Bildung bakterieller Biofilme auf den Tuben und Infektionen der oberen Atemwege verhindert werden. Außerdem ist die kovalente Verknüpfung mit alkindekorierten Goldnanopartikeln für Zelluntersuchungen mittels Elektronenmikroskopie vorstellbar. Für die Identifikation von Sphingolipid-Protein-Interaktionen mittels Massenspektrometrie kann die Click-Konjugation mit alkinfunktionalisierten Agarose-Beads oder Nanodiamanten erfolgen.

Die bioorthogonal modifizierten Sphingolipidanaloga sollen in weiterführenden Forschungsprojekten eingesetzt werden, um die Rolle von Sphingolipiden und deren assoziierten Enzymen bei der Coronavirus-Replikation aufzuklären. Die Kombination aus Click-Chemie, hochauflösender Massenspektrometrie und Fluoreszenzmikroskopie kann möglicherweise Ziele für antivirale Medikamente gegen verschiedene Coronaviren wie SARS-CoV-2, MERS-CoV und TGEV identifizieren.

Alles in allem tragen die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen dazu bei, die Rolle von Sphingolipiden bei Infektionsprozessen und Krankheitsverläufen auf subzellulärer Ebene aufzuklären. Dadurch wird ein entscheidender Beitrag für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe gegen bakterielle oder virale Erreger sowie innovativer Therapien gegen verschiedene humane Krankheiten geliefert.

6 Summary

The cell represents the smallest unit of life and is characterized by the highly coordinated arrangement of several million (bio)molecules to form a micrometer-sized object. As a structural component of the lipid bilayer of eukaryotic cells, in addition to sterols and glycerophospholipids, the compound class of sphingolipids plays a central role in maintaining membrane integrity.^[472] In addition, bioactive sphingolipids are critically involved in many basic cellular processes such as apoptosis, growth, differentiation, migration and adhesion.^[87,120] A disturbed balance of the sphingolipid metabolism and defects in the corresponding metabolic pathways are associated with many diseases such as cancer, diabetes, obesity, arteriosclerosis, chronic inflammation and autoimmune diseases as well as viral and bacterial pathogenesis.^[22,143,473,474]

The development and application of sphingolipid analogues as potential active ingredients have moved more and more into the focus of interdisciplinary research by biologists, chemists and medical professionals in recent years. The best-known example is fingolimod (FTY720), which is now successfully used as a sphingosine-1-phosphate mimetic under the brand name Gilenya[®] as a drug for the treatment of multiple sclerosis.^[475] However, there is a risk that fingolimod can damage other cell functions and lead to serious side effects such as bradycardia.^[476] Since sphingolipids are also essential for the control of bacterial and viral infections, sphingolipids and their synthetically produced derivatives are playing an increasing role in the development of active ingredients in the fight against pathogenic germs.^[175,477-479] The mode of action of antimicrobial sphingolipids has not yet been fully elucidated. A comprehensive investigation of the underlying cellular mechanisms at the molecular level is crucial for further development of known drugs against various diseases or for the development of novel active substances against pathogens.

Due to the relatively easy detection by fluorescence microscopy, fluorescence-labeled sphingolipid derivatives are widely used for this purpose.^[480] However, the covalently bonded dye unit has significant disadvantages since the biological properties of the biomolecules can differ from the natural substrates concerning structure and polarity changes. The usage of bioorthogonally functionalized biomolecules avoids this problem because the structural changes are kept to a minimum. After the cellular incorporation of these derivatives, rapid and specific conjugation with a complementary fluorophore at a desired point of time is possible by so-called click reactions such as CuAAC or SPAAC.^[12,46]

The concept of click chemistry has already been applied to a large number of biomolecules such as sphingolipids, fatty acids, amino acids, proteins, carbohydrates, nucleosides or nucleic acids (DNA and RNA).^[47,280] However, further specifically modified compounds are required, allowing diverse bioorthogonal reactions for the investigation of cell processes – both *in vitro* and *in vivo*.

In order to develop new therapeutic approaches against numerous diseases and to avoid serious side effects, detailed research into highly complex cell processes at the molecular level is of crucial importance. Therefore, the aim of this work was the synthesis and characterization of molecular tools which, in combination with several current microscopy and mass spectrometry methods, enable the visualization and investigation of the sphingolipid metabolism and other biological processes.

As part of this work, various sphingolipids and novel derivatives were synthesized starting from the amino acid L-serine as chiral precursor. Known synthetic methods were used for selective building of the natural sphingoid structure. The C₁₈-backbone of the ceramides **4** and **5** could be successfully built up both *via* olefin cross-metathesis and Liebeskind-Srogl coupling. In cooperation with the working groups of Dr. Niklas Beyersdorf (JMU Würzburg) and Dr. Sofia Dembski (Fraunhofer Institute for Silicate Research ISC Würzburg) these two ceramides were used for the production of ceramide-containing liposomes (Figure 53). These served as model systems of T cell membranes and contributed to making statements about the incorporation efficiency of externally added ceramides at certain initial ceramide concentrations. In general, the ceramides **4** and **5**, especially in the form of liposomes, are helpful tools for further investigations of the biophysical properties of cell membranes.

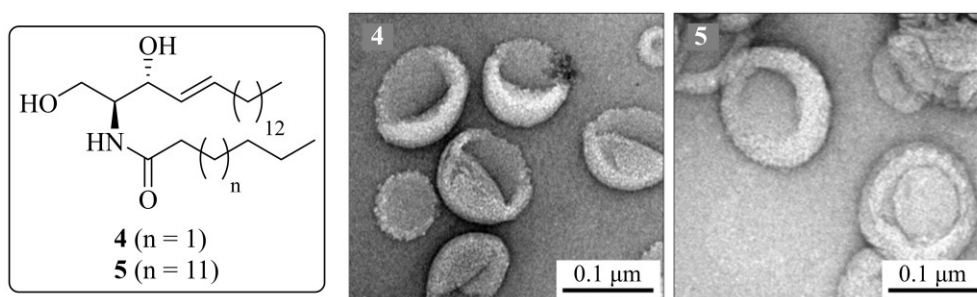


Figure 53: Synthesized natural sphingolipids C₆-ceramide (**4**) and C₁₆-ceramide (**5**), which were used for the production of artificial model membranes (right: TEM images of the liposomes).

Since the azide-modified ceramide derivatives **8**, **9** and **11** have proven to be powerful tools for elucidating biological processes in previous work, they were synthesized for further projects (Figure 54). In the aforementioned liposome project, incorporation of the ω -N₃-ceramides **8** and **9** in the model double membranes at different initial ceramide concentrations was quantitatively investigated using LC-MS/MS and UV/Vis spectroscopy after SPPAC reaction with a DIBO-modified fluorophore. It has been shown that a higher initial ceramide content leads to an increased incorporation of clickable ceramides. This supports the assumption that mouse regulatory T cells (T_{reg}) have a higher ceramide content in the plasma membrane than conventional T cells (T_{conv}).

In another project of the research group of Dr. Niklas Beyersdorf (JMU Würzburg) ω -N₃-C₆-cer (**8**) was used to investigate the incorporation of C₆-ceramide in human T cell subsets. The quantification was carried out using flow cytometry (FACS analysis) after the click reaction with a DIBO-modified fluorophore. In the clinical study of Wiese *et al.* it has been shown that ASM-inhibiting antidepressants in patients with major depression induce a stronger relative increase in T_{reg} in the human peripheral blood than non- or weakly inhibiting antidepressants.^[366] A targeted increase of T_{reg} concentration using ASM inhibitors could in future be used in the treatment of patients with autoimmune diseases.

The long-chain ω -N₃-C₁₆-Cer (**9**) was used in a project of the group of Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies (JMU Würzburg) to investigate the localization of ceramides in dendritic cells after measles virus infection for the first time. After pathogen contact, increased endocytic activity of the cells was observed (Figure 54).

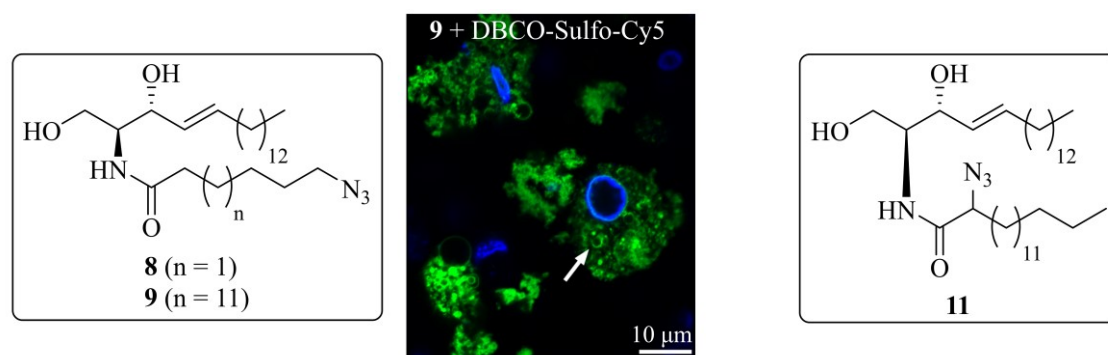


Figure 54: Synthesized azide-functionalized ceramide derivatives suitable for bioorthogonal click reactions with alkynes. The visualization of ω -N₃-C₁₆-cer (**9**) in dendritic cells after measles virus infection should help to understand the physiological effects of lipid dynamics on the immune response.

In combination with alkyne-modified photoswitchable dyes, the azide-functionalized ceramide derivatives are suitable for high-resolution fluorescence microscopy methods such as *d*STORM. Since these high-resolution techniques require extensive equipment and are mostly limited to specialized laboratories, a ceramide analogue suitable for expansion microscopy (ExM) was synthesized as part of this work. This enables high-resolution fluorescence imaging below the Abbe limit with simple light microscopy. The ExM-compatible α -NH₂- ω -N₃-C₆-ceramide (**74**) successfully synthesized starting from protected L-lysine derivatives and sphingosine has a primary amino group for anchoring into the swellable hydrogel in addition to the azide function for conjugation with a fluorophore. The anchoring is based on the covalent linkage *via* the glutaraldehyde (GA) network that is formed during cell fixation (Figure 55 A). The groups of Prof. Dr. Markus Sauer and Dr. Vera Kozjak-Pavlovic (JMU Würzburg) showed that the ceramide derivative **74** is only washed out to a limited extent by detergents after cell fixation (Figure 55 B). In this project, sphingolipid-ExM was used for the first time for imaging the inner and outer membrane of bacteria in human cells after 10-fold expansion with a spatial resolution of 10–20 nm (Figure 55 C).^[388]

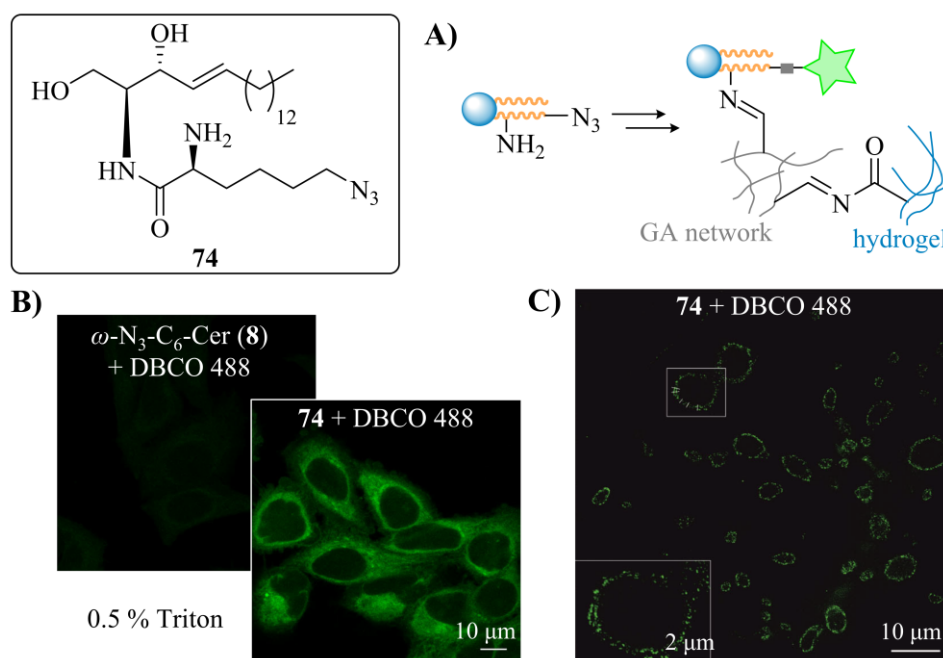


Figure 55: α -NH₂- ω -N₃-C₆-ceramide (**74**) synthesized for expansion microscopy, which is anchored in cellular membranes and in the swellable hydrogel by glutaraldehyde (A). The linkage to the GA network prevents the lipid from being washed out from fixed HeLA229 cells by surfactants (B). The fixation in the hydrogel enables a 10-fold expansion of the sample, so that the inner and outer membrane of intracellular bacteria (*C. trachomatis*) can be displayed and distinguished with high resolution by means of illumination microscopy (C).^[388]

The results demonstrate that the molecular tool amino(azido)ceramide **74** is suitable for high-resolution imaging of cell membranes and, in combination with antibody-based immunolabeling, for the visualization of interactions between proteins and ceramides in 4- and 10-fold expanded samples. It is also possible to visualize bacterial pathogens in infected cells with a spatial resolution that was previously only feasible with electron microscopy. The newly developed sphingolipid-ExM method based on **74** is therefore of great use for detailed studies of bacterial infection mechanisms and for the development of antibiotics with improved membrane permeability.^[388]

In addition to ceramide derivatives with an azide function, two cyclooctene-modified ceramide analogues were synthesized in this work, which should enable extremely fast bioorthogonal conjugation with tetrazine fluorophores by iEDDA. Starting from a TCO-containing active ester, partial isomerization to the *Z*-conformers occurred during the synthesis of the cyclooctene-modified C₆- and C₁₆-carboxylic acids. After the amide coupling with sphingosine, the cyclooctene-functionalized C₆- and C₁₆-ceramide derivatives **81** and **84** were isolated as *E/Z*-isomer mixtures (Figure 56).

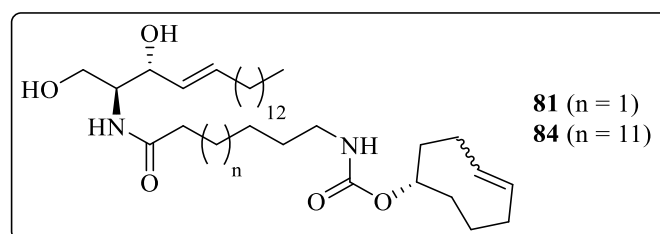


Figure 56: Synthesized cyclooctene-modified ceramide derivatives, which should enable the visualization of sphingolipid dynamics in living cells by iEDDA with suitable tetrazine dyes.

In subsequent experiments by the group of Prof. Dr. Markus Sauer (JMU Würzburg), the cyclooctenylceramide derivatives **81** and **84** are used in combination with suitable tetrazine dyes for the investigation of sphingolipid dynamics *in vivo* with high-resolution fluorescence microscopy. The greatest advantage of the fluorogenic tetrazine dyes is their “turn-on” effect, which leads to an increase in fluorescence after the click reaction and thus to a higher signal-to-noise ratio. As a result, even with very small amounts of substance, high-contrast images with low background fluorescence are obtained without further washing processes.

In addition to ceramide derivatives with functionalized *N*-acylated side chains, bioorthogonally modified sphingoid bases were also synthesized in this work. The synthesis of ω -N₃-sphingosine (**47**), *via* an olefin cross-metathesis reaction as the key step to form the C₁₈-backbone, was based on a previous master's thesis and made a decisive contribution to the success of various interdisciplinary projects.^[282]

The group of Prof. Dr. Karl S. Lang (University Duisburg-Essen) used the azide-functionalized sphingosine derivative **47** to investigate the antiviral properties of macrophages. The study shows that cell infection with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is prevented by the binding of sphingosine-rich intraluminal vesicles (ILVs) to the virus particles in multivesicular bodies (MVBs). The clickable analogue **47** was used in co-localization experiments to show the sphingosine-virus interaction (Figure 57 A).^[406] The observed connection between targeted increase in sphingosine content and inhibition of HSV-1 replication should enable the development of new therapeutics against viral infections based on the sphingolipid metabolism.

In another cooperation project with the group of Prof. Dr. Thomas Rudel (JMU Würzburg), the influence of antibacterial sphingosine on the growth of intracellular gonococci was examined with aid of ω -N₃-sphingosine (**47**). The sphingosine analogue **47** was efficiently taken up by *Neisseria gonorrhoeae* from the human host cells and specifically incorporated into their membranes (Figure 57 B). The study provides evidence of an association of sphingosine with intracellular bacterial membranes for the first time and indications that the incorporation of sphingosine into the *Neisseria* membrane leads to death of the bacteria.^[408] By using mass spectrometry, the group of Prof. Dr. Burkhard Kleuser (University Berlin and Potsdam) also demonstrated that ω -N₃-sphingosine (**47**) behaves physiologically like the natural substrate and is phosphorylated by sphingosine kinase 1 (SphK1) both *in vitro* and *in vivo*.

With the support of the groups of Prof. Dr. Markus Sauer and Dr. Vera Kozjak-Pavlovic (JMU Würzburg), ω -N₃-sphingosine (**47**) was used in expansion microscopy experiments, which resulted in high-resolution images of the sphingosine incorporation in intracellular *Neisseria* (Figure 57 C).^[388] The azide-modified sphingosine derivative **47** with a free amino group is, like amino(azido)ceramide **74**, a powerful tool for the detailed imaging of intracellular bacterial membranes by the novel sphingolipid ExM. This promotes further investigations of pathogen-host interactions and the development of new antibiotics against multidrug-resistant germs.

In another project of the group of Prof. Dr. Alexandra Schubert-Unkmeir (JMU Würzburg), ω -N₃-sphingosine (**47**) was used in combination with light microscopy and electron microscopy to investigate the mechanism of action of antibacterial sphingolipids against the microbial pathogen *Neisseria meningitidis* (Figure 57 D). It was shown that ω -N₃-sphingosine (**47**) induces a concentration-dependent membrane change and disturbance of the bacteria. At a tenth of the minimal bactericidal concentration (MBC), cells with intact intracellular content but with elongations and distension of the outer membrane were observed. Correlative light and electron microscopy (CLEM), in which azide **47** was fluorescently-labeled *via* SPAAC, as well as HPLC-MS/MS analysis of the membrane fractions confirmed the incorporation of the sphingosine derivative into the outer bacterial membrane.^[411] These results demonstrate the primary effect of sphingosine on the outer membrane of bacteria and provide further insights into the mechanism of action of antibacterial sphingolipids.

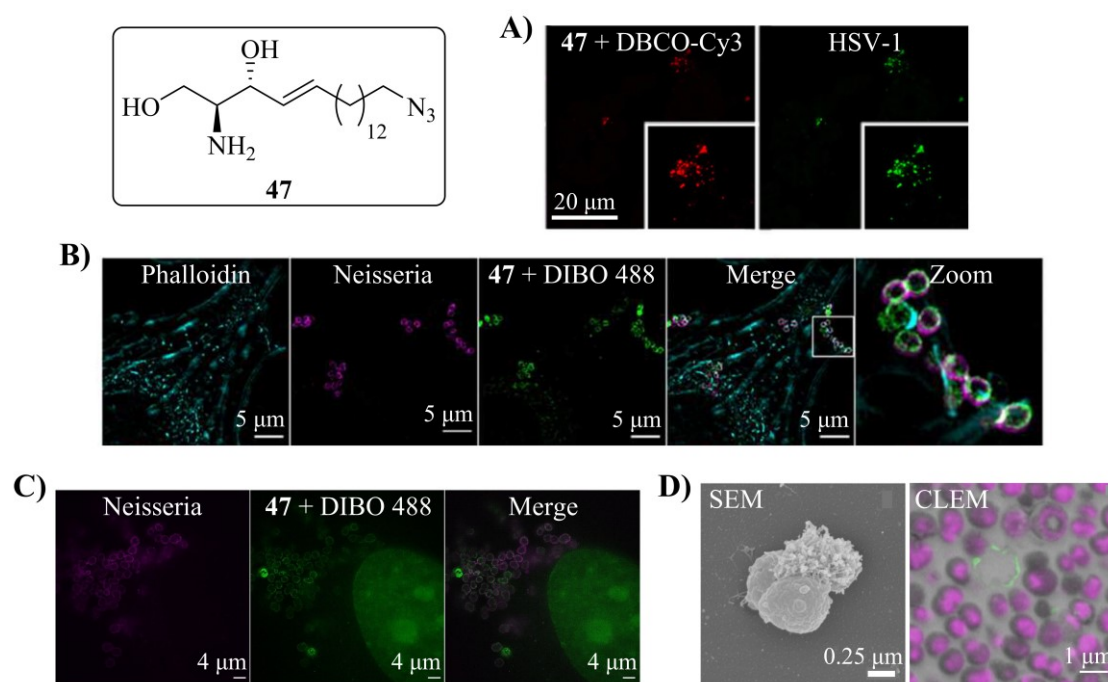


Figure 57: Synthesized ω -N₃-sphingosine (**47**), which was visualized in various biological systems *via* SPAAC with alkyne-functionalized fluorophores. A) Co-localization of **47** and HSV-1 in macrophages shows a virus-sphingosine interaction that leads to the inhibition of virus replication.^[406] B) Indications of the antibacterial effect of sphingosine through the uptake and incorporation of **47** into the membrane of *N. gonorrhoeae* in infected Chang cells.^[408] C) Visualization of **47** in intracellular *Neisseria* membranes with higher spatial resolution by expansion microscopy (4x expansion).^[388] D) Examination of the bactericidal effect of **47** against *N. meningitidis* by electron microscopy and light microscopy.^[411]

Starting from ω -N₃-sphingosine (**47**), various ceramide derivatives were synthesized, which do not lead to a loss of the sphingolipid label due to the conversion of ceramidases. In further experiments, the ω -N₃-ceramides **90**, **91** and **92** (Figure 58) are examined regarding their potential antibacterial effect and are used for click reactions in living cells and as standard compounds for MS-based metabolism assays.

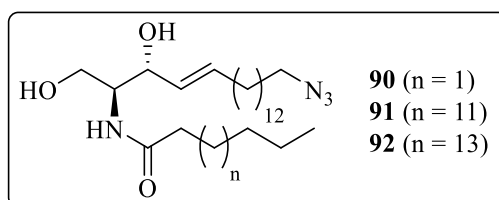


Figure 58: Ceramide derivatives with an azide-functionalized sphingolipid backbone synthesized starting from ω -N₃-sphingosine (**47**) and suitable for the evaluation of lipid dynamics *in vivo*.

The principle of bioorthogonal labeling was transferred to sphinganine, an important metabolic precursor of complex sphingolipids, as part of this work. Based on the synthetic route of ω -N₃-sphingosine (**47**), ω -N₃-sphinganine (**93**) was obtained *via* an olefin cross-metathesis reaction as the key step for building up the C₁₈-backbone. In cooperation with the groups of Prof. Dr. Burkhard Kleuser (University Berlin and Potsdam) and Prof. Dr. Markus Sauer (JMU Würzburg), the azide-modified sphinganine analogue **93** was used for the development of a general method for investigating *de novo* sphingolipid biosynthesis.^[422] In the microsomal *in vitro* assay, ω -N₃-sphinganine (**93**) being a substrate of ceramide synthases (CerS) was converted into the azide-modified dihydroceramide species. This species was accepted by dihydroceramide desaturase (DEGS) and metabolized to the final azido-ceramide **107** (Figure 59 A). The mass spectrometric analysis also showed that the phosphorylation of ω -N₃-sphinganine (**93**) is catalyzed by SphK1.

To make statements about how the click reaction with a fluorophore affects the acceptance of the sphingolipid-metabolizing enzymes, azide **93** was first conjugated with a DBCO-modified BODIPY dye (**110**) *via* SPAAC and the triazole crude product was used as substrate in the *in vitro* synthesis assay. The analysis using LC-MS(/MS) demonstrated that the BODIPY-sphinganine conjugate **111** is metabolized to the final ceramide species **113** despite the changed molecular size and polarity (Figure 59 A). In this project, the enzymatic conversion of a fluorophore-labeled sphinganine derivative with a molecular weight of over 1140 g·mol⁻¹ and the detection of the corresponding metabolites by LC-MS(/MS) were carried out for the first time.^[422] The use of the crude click product generally enables quick and qualitative statements

whether the sphingolipid metabolism proceeds in cell experiments after conjugation. Overall, ω -N₃-sphinganine (**93**) is a valuable compound for studying the downstream metabolites of sphinganine and the complex sphingolipid metabolism, which supports the development of new sphingolipid-based therapeutics.

By means of labeling experiments in living cells, fluorescence microscopy revealed that ω -N₃-sphinganine (**93**) is mainly localized in tubules of the endoplasmic reticulum (ER) and thus mimics native sphinganine. In the tested cell lines (U2OS, COS7) the fluorescence signal after click reaction with DBCO-BODIPY **110** was very robust and intense *in vivo*, so that azido-sphinganine **93** is a novel molecular tool for efficient ER membrane labeling (Figure 59 B).^[422]

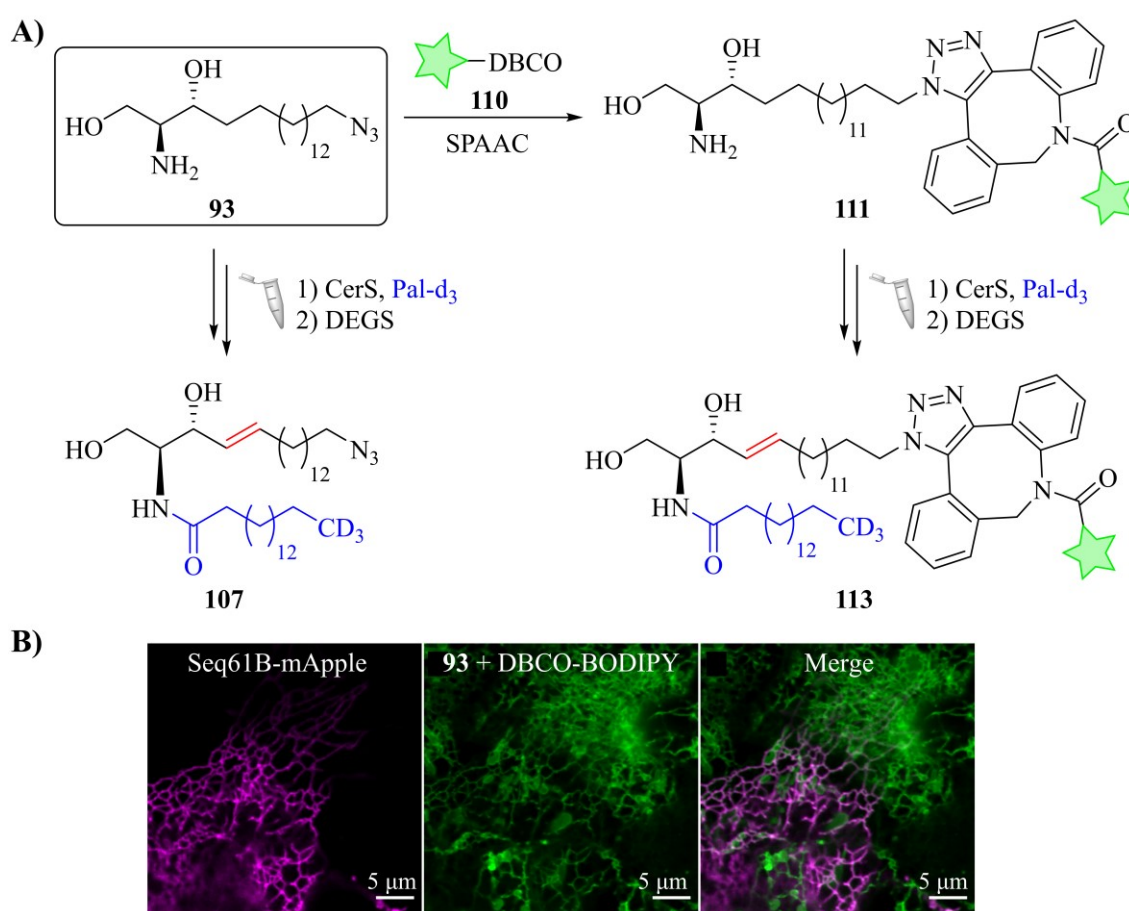


Figure 59: Synthesized ω -N₃-sphinganine (**93**), which was used in combination with LC-MS(/MS) and fluorescence microscopy as a tool to elucidate the *de novo* biosynthesis of sphingolipids. A) In the microsomal *in vitro* assay **93** is recognized as a substrate and metabolized to ceramide species **107**. After the click reaction with DBCO-BODIPY **110**, the conjugate **111** is also converted to the final ceramide species **113**. B) Co-localization of ER marker and sphinganine derivative **93** in ER tubules of living COS7 cells confirms that the clickable analogue behaves physiologically like native sphinganine.^[422]

Moreover, compound **93** is suitable as a metabolic Gb3 precursor, as demonstrated by the groups of Prof. Dr. Nurcan Üçeyler (University Hospital Würzburg) and Prof. Dr. Markus Sauer (JMU Würzburg). Morphological analysis of living nerve cells from a healthy person and a Fabry patient indicate peripheral denervation due to Gb3 accumulation, disrupted lysosomal integrity and mitochondrial impairment (Figure 60).

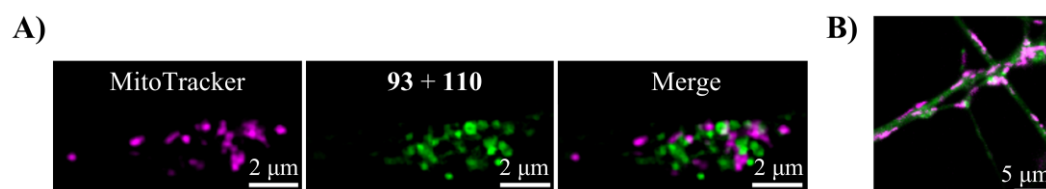


Figure 60: A) Synthesized ω -N₃-sphinganine (**93**) leads to fragmentation and shrinkage of the mitochondria after incorporation into neurons. B) Co-localization of mitochondrial marker and **93** in FD-1 neurons shows possible mitochondrial blockage due to sphinganine or Gb3 accumulation.

In addition to ω -N₃-sphingoid bases, whose phosphorylation of the primary hydroxy function is catalyzed by SphK1, 1-azido modified sphingoid bases were synthesized as part of this work. The kinase-catalyzed conversion of 1-N₃-sphingoid bases is specifically prevented (Figure 61).

In the aforementioned project realized of the group of Prof. Dr. Thomas Rudel (JMU Würzburg) 1-N₃-sphingosine (**123**) showed a stronger toxic effect on intracellular gonococci than ω -N₃-sphingosine (**47**) (Figure 61). The substitution of the hydroxy group with an azide function leads to the fact that the metabolism to the SIP derivative is inhibited and thus the concentration of antibacterial sphingosine (derivative) remains increased.^[408]

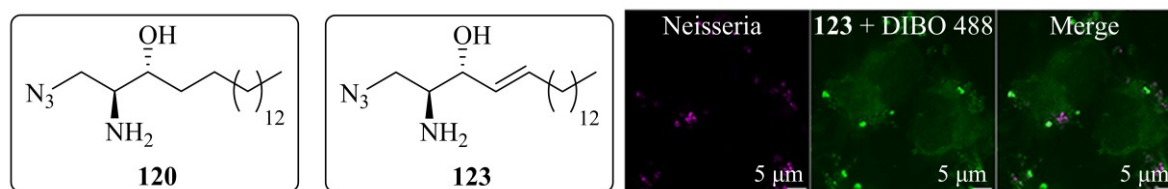


Figure 61: Synthesized 1-N₃-sphinganine (**120**) and 1-N₃-sphingosine (**123**), for which the kinase-catalyzed phosphorylation of the head group is not possible. Consequently, **123** shows a strong antibacterial effect against *N. gonorrhoeae* in infected Chang cells.^[408]

The two 1-N₃-sphingolipids **120** and **123** as well as their click conjugates with various alkynes represent potential SphK1 inhibitors and thus interesting tumour suppressive drug candidates against cancer. Furthermore, starting from **120** and **123**, potential inhibitors of acid sphingo-

myelinase (ASM) have already been synthesized, which could also be used against various diseases such as cancer or depression.^[317]

Another disease associated with bioactive sphingolipids like ceramide and S1P is type 2 diabetes (T2D). Remarkably, the uptake of *trans*-palmitic acid (TPA) reduces the risk of developing T2D, but the exact health-promoting mechanism of action has not been elucidated yet. The investigation of the metabolic pathways starting from TPA by means of mass spectrometry is therefore of great medical interest. Hence, as part of this work, the TPA-derived sphingolipids (11*E*)-sphinganine (**126**) and S1P analogue **127** were synthesized as mass spectrometry standards (Figure 62 A). The group of Prof. Dr. Burkhard Kleuser (University Berlin and Potsdam) was able to use the reference compound (11*E*)-sphinganine (**126**) to demonstrate the *de novo* biosynthesis of atypical sphingolipids up to the final ceramide species starting from TPA for the first time using high-resolution mass spectrometry, both *in vitro* and *in vivo* (Figure 62 A).

The SphK1-catalyzed phosphorylation of **126** to **127** was also clearly demonstrated using the synthesized standard substances (Figure 62 B). Thus, within the scope of this work, two MS reference compounds were synthesized which enable the identification of new therapeutic targets in subsequent TPA metabolism studies.

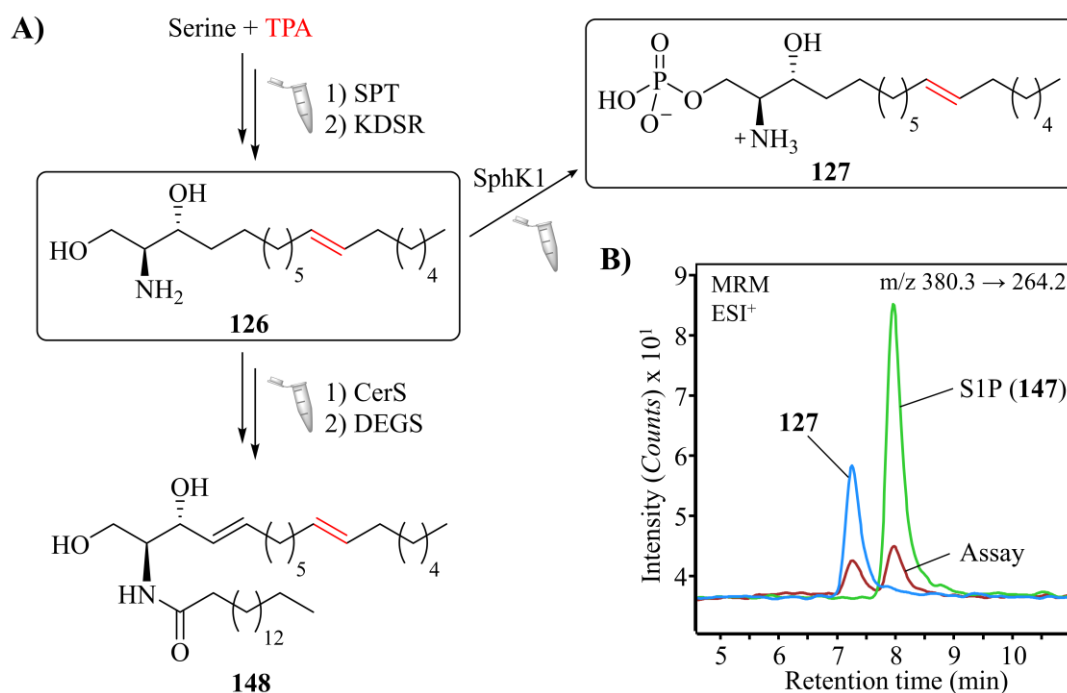


Figure 62: Synthesized atypical (11*E*)-sphinganine (**126**) and the phosphorylated species **127**, which were used as MS standard substances for the detection of TPA-derived sphingolipids. In the cell-free *de novo* synthesis assay, **126** is formed and metabolized to the final atypical ceramide species **148**. B) The SphK1-catalyzed formation of (11*E*)-S1P (**127**) was confirmed by LC-MS/MS.

In summary, a variety of sphingolipids and their bioorthogonally functionalized analogues were successfully synthesized in this work starting from the amino acid L-serine. In combination with mass spectrometry and fluorescence or electron microscopy, the presented compounds are suitable as molecular tools for the investigation of the complex sphingolipid metabolism as well as the incorporation and dynamics of sphingolipids in model and cell membranes. The azide-modified sphingolipids were visualized by click reactions in human and animal cells as well as in bacteria to gain a better understanding of bacterial and viral infection processes. The modular approach of click chemistry enables the use of different complementarily functionalized dyes that have different properties in terms of membrane permeability or absorption and emission wavelengths and can therefore be used in a targeted manner depending on the biological issue.

The synthesized azide-functionalized sphingolipid analogues also represent precursors for potential inhibitors of sphingolipid-metabolizing enzymes, which is of great medical interest. By conjugation with various alkynes, a comprehensive library of drug candidates for the treatment of various diseases can be generated in a short time. Furthermore, the flexibility of click chemistry enables the increase and optimization of the bactericidal properties of the resulting sphingolipid derivatives, thereby promoting the development of new types of sphingolipid-based antibiotics. Another possible application of the bioorthogonally modified sphingolipids is their covalent linkage to the polymer surface of ventilation tubes, so that the formation of bacterial biofilms on the tubes and infections of the upper respiratory tract are prevented. In addition, the covalent linkage with alkyne-decorated gold nanoparticles for cell examinations using electron microscopy is conceivable. To identify sphingolipid-protein interactions using mass spectrometry, click conjugation can be carried out with alkyne-functionalized agarose beads or nanodiamonds.

The bioorthogonally modified sphingolipid analogues are to be used in further research projects to elucidate the role of sphingolipids and their associated enzymes in coronavirus replication. The combination of click-chemistry, high-resolution mass spectrometry and fluorescence microscopy can potentially identify targets for antiviral drugs against various coronaviruses such as SARS-CoV-2, MERS-CoV and TGEV.

All in all, the compounds synthesized in this work help to elucidate the role of sphingolipids in infection processes and disease progression at subcellular level. This makes a decisive contribution to the development of novel active substances against bacterial or viral pathogens as well as of innovative therapies against various human diseases.

7 Experimententeil

7.1 Materialien, Geräte und Methoden

7.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die zur Synthese verwendeten Chemikalien wurden kommerziell von den Firmen *abcr*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Jena Bioscience*, *SiChem*, *Sigma-Aldrich* und *TCI* bzw. über die Chemikalienversorgung der Universität Würzburg bezogen. Alle Reagenzien wurden mit dem Reinheitsgrad des Herstellers und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel, außer Methanol und Ethanol (p. a.), wurden zuvor durch Destillation gereinigt. Absoluierte Lösungsmittel wurden durch eine SPS-Anlage der Firma *Inert* oder nach gängigen Standardmethoden getrocknet. Es wurde stets vollentsalztes (dest.) Wasser verwendet.

7.1.2 Gase

Alle Reaktionen unter Schutzgasatmosphäre wurden in ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt. Als Schutzgas wurde Stickstoff (99.996 %) und bei Hydrierungsreaktionen wurde Wasserstoff (99.999 %) der Firma *Linde* eingesetzt.

7.1.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle und zur Bestimmung der R_F -Werte wurden mit Kieselgel (Porengröße 60 Å) beschichtete Aluminiumfolien (ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄) bzw. Polyester-Fertigfolien (POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄) der Firma *Macherey-Nagel* oder mit Aluminiumoxid (Alox, neutral, Porengröße 60 Å, F₂₅₄) beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 0.2 mm verwendet. Die Zusammensetzung der Lösungsmittelgemische ist im Volumenverhältnis (V:V) angegeben, wobei stets destillierte Lösungsmittel verwendet wurden. Die Visualisierung der aufgetragenen Stoffe erfolgte durch Eintauchen der DC-Folien in eine Kaliumpermanganat-Lösung (1.50 g KMnO₄, 10.0 g K₂CO₃ und 100 mg NaOH in 200 mL dest. H₂O) oder eine Ninhydrin-Lösung (600 mg Ninhydrin und 6.00 mL Eisessig in 200 mL *n*-Butanol) und anschließendem, vorsichtigem Erhitzen. UV-aktive oder fluoreszenzlöschende Substanzen wurden mit einer UV-Lampe des Typs NU-6 KL der Firma *Benda*, bei Wellenlängen von 254 nm oder 366 nm sichtbar gemacht.

7.1.4 Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Reinigungen wurden in selbstgepackten Glassäulen mit Kieselgel 60 (Korngröße 0.040–0.063 mm, *Macherey-Nagel*) als stationäre Phase durchgeführt. Länge und Durchmesser der Säule sowie die eingesetzte Menge an Kieselgel wurden reaktionsspezifisch abgestimmt. Die Zusammensetzung der Lösungsmittelgemische ist im Volumenverhältnis (V:V) angegeben, wobei stets destillierte Lösungsmittel verwendet wurden.

7.1.5 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden mit einem *Bruker Avance III HD 400*-Spektrometer (Messfrequenzen für ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, ^{31}P : 160 MHz, ^{11}B : 128 MHz) und einem *Bruker Avance III HD 600*-Spektrometer (Messfrequenzen für ^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) bei 295 K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben. Für die Kalibrierung der ^1H -NMR-Spektren diente das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels als interner Standard gegenüber Tetramethylsilan (SiMe_4) mit $\delta^1\text{H}(\text{CDCl}_3) = 7.26$ ppm und $\delta^1\text{H}(\text{CD}_3\text{OD}) = 3.31$ ppm. Die Kalibrierung der ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte über das ^{13}C -Resonanzsignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels mit $\delta^{13}\text{C}(\text{CDCl}_3) = 77.16$ ppm und $\delta^{13}\text{C}(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.00$ ppm.^[481]

Bei externer Referenzierung galt für die Standards: $\delta^1\text{H}(\text{SiMe}_4)$, $\delta^{13}\text{C}(\text{SiMe}_4)$, $\delta^{15}\text{N}(\text{MeNO}_2)$, $\delta^{11}\text{B}(\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O in CDCl}_3) = 0$ ppm sowie $\delta^{31}\text{P}(0.1 \text{ M P(OMe)}_3 \text{ in CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}) = 140.0$ ppm (d. h. $\delta^{31}\text{P}(85 \text{ Gew.-% H}_3\text{PO}_4 \text{ in H}_2\text{O}) = 0$ ppm).^[482,483]

Die genaue Signalzuordnung erfolgte mit Hilfe von COSY-, DEPT-135-, HSQC- und HMBC-Spektren. Die Multiplizitäten sind als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), deren Kombinationen (z. B. dtd (Dublett von Triplets von Dubletts)) und m (Multipllett) bezeichnet. Diese wurden an den jeweiligen Signalmittelpunkten (Bereich bei Multipllett) angegeben. Sofern ein verbreitertes Signal auftritt, ist dies mit br (*broad*) gekennzeichnet, während scheinbare Multiplizitäten mit dem Präfix app (*apparent*) versehen sind. Die ^{15}N -Signale wurden indirekt aus den Projektionen der ($^1\text{H}, ^{15}\text{N}$)-HMBC- und -HSQC-Spektren ermittelt. Kopplungskonstanten J sind stets als Beträge in Hz angegeben.

Die Nummerierung der H- und C-Atome für die Signalzuordnung (siehe Strukturformeln) entspricht nicht der IUPAC-Nomenklatur. Bei *E/Z*-Isomeren und Rotameren sind verschiedene Signale für ein Atom bzw. eine Atomgruppe mit einem „/“ getrennt.

Sowohl die IUPAC-Namen der synthetisierten Verbindungen als auch deren vereinfachte Bezeichnungen sind in den Überschriften zu finden.

Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Spektren wurde das Programm TopSpin 3.6.1 von *Bruker* verwendet.

7.1.6 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden mit einem *Bruker* Daltonics micrOTOF, einem micrOTOF-Q III-Instrument und mit einem *Thermo Scientific* Exactive Plus Orbitrap-Spektrometer aufgenommen. Die Methoden waren hierbei ESI (Elektrospray-Ionisation) und APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*).

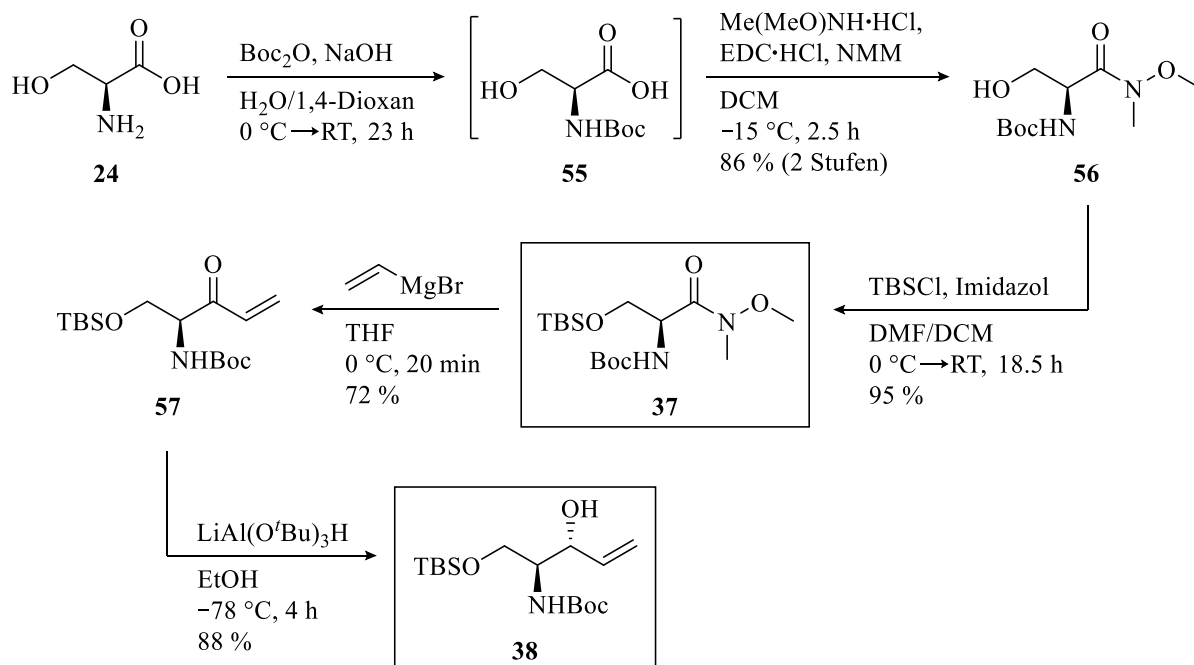
7.1.7 Weitere Geräte

Gerät	Typ/Modell	Hersteller/Firma
Analysewaage	ALS 220-4	<i>Kern</i>
Mikrowaage	MC5	<i>Sartorius</i>
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-3	<i>Büchi</i>
	Hei-VAP Core	<i>Heidolph Instruments</i>
Thermomixer	Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf</i>
Tischzentrifuge	1-15	<i>SIGMA</i>
Ultraschallbad	SONOREX Super RK 106	<i>Bandelin</i>
Vakuumpumpen	MZ 2C (Membranpumpe)	
	RZ 6 (Drehschieberpumpe)	<i>VACUUBRAND</i>
	RC 5 (Chemie-Hybrid-Pumpe)	

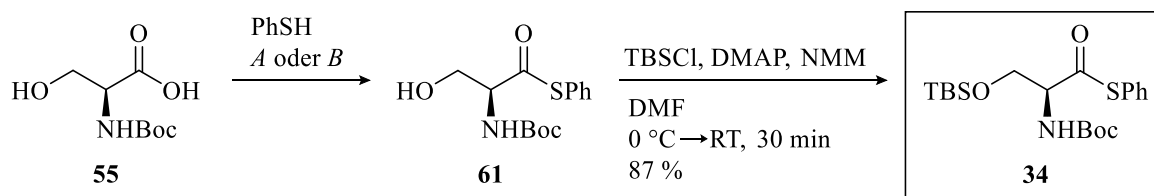
7.2 Synthesevorschriften

7.2.1 Synthese wichtiger Vorstufen der Sphingolipidkopfmotive

Für Grignard- und Grubbs-Metathese-Reaktionen:



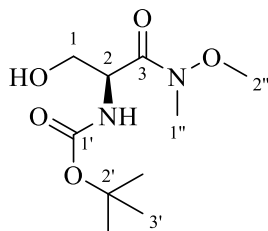
Für Liebeskind-Srogl-Kupplung:



A:
EDC·HCl, DMAP
DCM
RT, 2.5 h
44 %

B:
DCC, HOBT·H₂O
EtOAc/DCM
RT, 2 h
65 %

***tert*-Butyl(*S*)-(3-hydroxy-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate /
N-Boc-L-Serin-Weinreb-Amid (**56**)**



Zu einer Lösung aus 16.0 g (401 mmol, 1.05 Äq.) NaOH in H₂O (300 mL) wurden bei 0 °C 40.1 g (382 mmol, 1.00 Äq.) L-Serin (**24**) gegeben. Die Mischung wurde bei 0 °C innerhalb von 3 h tropfenweise mit einer Lösung aus 100 g (458 mmol, 1.20 Äq.) Boc₂O in 1,4-Dioxan (300 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt und daraufhin mit Cy (2 x 300 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M NaHSO₄-Lösung auf pH = 2 gebracht und mit EtOAc (5 x 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (500 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und die Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt, wobei *N*-Boc-L-Serin (**55**) als farbloses, hochviskoses Öl erhalten wurde.

Das Rohprodukt wurde unter Schutzgasatmosphäre in trockenem DCM (500 mL) gelöst und bei -15 °C mit 49.1 mL (439 mmol, 1.15 Äq.) NMM und 42.9 g (439 mmol, 1.15 Äq.) *N,O*-Dimethylhydroxylamin·HCl versetzt. Zur Mischung wurden innerhalb von 30 min portionsweise 82.2 g (439 mmol, 1.15 Äq.) EDC·HCl gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei -15 °C gerührt und daraufhin mit Eis (200 g) und 1 M HCl (800 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (4 x 400 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (400 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 81.5 g (328 mmol, 86 % über 2 Stufen) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₀H₂₀N₂O₅ (248.28 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 1:2, KMnO₄): 0.13.

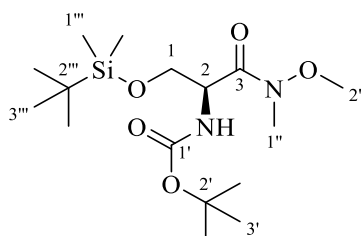
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.43 (s, 9H, *H*-3'), 2.69 (br s, 1H, *OH*), 3.21 (s, 3H, *H*-1''), 3.76 (s, 3H, *H*-2''), 3.79–3.81 (m, 2H, *H*-1), 4.78 (app br s, 1H, *H*-2), 5.65 (br d, ³*J*_{NH,2} = 5.3 Hz, 1H, *NH*) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 28.4 (3C, *C*-3'), 32.2 (*C*-1''), 52.5 (*C*-2), 61.7 (*C*-2''), 63.8 (*C*-1), 80.2 (*C*-2'), 156.0 (*C*-1'), 171.1 (*C*-3) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $C_{10}H_{20}N_2NaO_5^+$ $[M+Na]^+$: 271.1264, gef.: 271.1268 ($|\Delta m/z| = 1.4$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[269,282,283,317,484]

***tert*-Butyl(*S*)-(3,8,8,9,9-pentamethyl-4-oxo-2,7-dioxa-3-aza-8-siladecan-5-yl)carbamat / 1-OTBS-*N*-Boc-*L*-Serin-Weinreb-Amid (37)**



Zu einer Lösung aus 28.5 g (115 mmol, 1.00 Äq.) des Alkohols **56** und 23.5 g (345 mmol, 3.00 Äq.) Imidazol in trockenem DMF (125 mL) wurde bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre innerhalb von 30 min eine Lösung aus 26.0 g (172 mmol, 1.50 Äq.) TBSCl in trockenem DCM (100 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei RT gerührt und daraufhin mit ges. NH₄Cl-Lösung (300 mL) und H₂O (200 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (4 x 200 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet, die Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 9:1→4:1) gereinigt.

Ausbeute: 39.6 g (109 mmol, 95 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₆H₃₄N₂O₅Si (362.54 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 5:1, KMnO₄): 0.15.

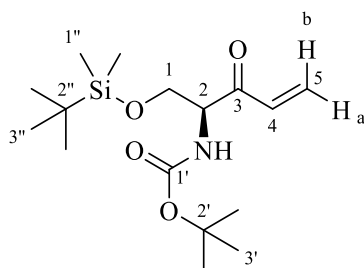
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 0.02, 0.02$ (jeweils s, zus. 6H, *H*-1'''), 0.85 (s, 9H, *H*-3'''), 1.43 (s, 9H, *H*-3'), 3.20 (s, 3H, *H*-1''), 3.74 (s, 3H, *H*-2''), 3.78 (dd, ²*J*_{1a,1b} = 10.0 Hz, ³*J*_{1a,2} = 5.2 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.84 (dd, ²*J*_{1b,1a} = 10.0 Hz, ³*J*_{1b,2} = 4.7 Hz, 1H, *H*-1_b), 4.72–4.76 (m, 1H, *H*-2), 5.35 (br d, ³*J*_{NH,2} = 8.8 Hz, 1H, *NH*) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = -5.4$ (2C, *C*-1'''), 18.4 (*C*-2'''), 25.9 (3C, *C*-3'''), 28.5 (3C, *C*-3'), 32.3 (*C*-1''), 52.6 (*C*-2), 61.6 (*C*-2''), 63.6 (*C*-1), 79.7 (*C*-2'), 155.5 (*C*-1'), 170.9 (*C*-3) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₁₆H₃₄N₂NaO₅Si⁺ [M+Na]⁺: 385.2129, gef.: 385.2131 (| $\Delta m/z$ | = 0.4 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[241,282,283,317,484]

***tert*-Butyl(*S*)-(1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-oxopent-4-en-2-yl)carbamat /
1-OTBS-*N*-Boc-Vinylketon (**57**)**



Zu einer Lösung aus 5.00 g (13.8 mmol, 1.00 Äq.) des Weinreb-Amids **37** in trockenem THF (30 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 27.6 mL (1 M in THF, 27.6 mmol, 2.00 Äq.) Vinylmagnesiumbromid-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei 0 °C gerührt und daraufhin mit 1 M HCl (200 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 60 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (150 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der hellgelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.26 g (9.91 mmol, 72 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₆H₃₁NO₄Si (329.51 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 5:1, KMnO₄): 0.42.

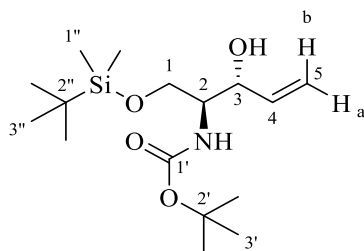
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = -0.01 (s, 3H, *H*-1''), 0.00 (s, 3H, *H*-1'), 0.83 (s, 9H, *H*-3''), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 3.85 (dd, ²*J*_{1a,1b} = 10.3 Hz, ³*J*_{1a,2} = 4.5 Hz, 1H, *H*-1_a), 4.00 (dd, ²*J*_{1b,1a} = 10.3 Hz, ³*J*_{1b,2} = 3.4 Hz, 1H, *H*-1_b), 4.57–4.61 (m, 1H, *H*-2), 5.52 (br d, ³*J*_{NH,2} = 7.3 Hz, 1H, *NH*), 5.81–5.84 (m, 1H, *H*-5_a), 6.34 (dd, ³*J*_{5b,4} = 17.4 Hz, ²*J*_{5b,5a} = 1.3 Hz, 1H, *H*-5_b), 6.55 (dd, ³*J*_{4,5b} = 17.4 Hz, ³*J*_{4,5a} = 10.6 Hz, 1H, *H*-4) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = -5.5$ ($C-1''$), -5.5 ($C-1''$), 18.3 ($C-2''$), 25.9 ($3\text{C}, C-3''$), 28.5 ($3\text{C}, C-3'$), 59.7 ($C-2$), 63.6 ($C-1$), 79.9 ($C-2'$), 129.5 ($C-5$), 133.3 ($C-4$), 155.4 ($C-1'$), 197.0 ($C-3$) ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NNaO}_4\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 352.19146, gef.: 352.19079 ($|\Delta m/z| = 1.9$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[241,282,283,316,317,329]

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxypent-4-en-2-yl)carbamat / 1-OTBS-*N*-Boc-Allylalkohol (38)**



Zu einer Lösung aus 6.60 g (20.0 mmol, 1.00 Äq.) des Ketons **57** in EtOH (250 mL) wurden bei -78 °C innerhalb von 4 h portionsweise 10.2 g (40.1 mmol, 2.00 Äq.) $\text{LiAl}(\text{O}^t\text{Bu})_3\text{H}$ gegeben. Das Reaktions-gemisch wurde daraufhin mit H_2O (200 mL) und 1 M HCl (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (4 x 200 mL) wurde die wässrige Phase mit 1 M HCl (100 mL) versetzt und nochmals mit EtOAc (3 x 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit ges. NaHCO_3 -Lösung (200 mL) und ges. NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der hellgelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 9:1→5:1) gereinigt.

Ausbeute: 5.84 g (17.6 mmol, 88 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{Si}$ ($331.53 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 5:1, KMnO_4): 0.26.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.05$ (s, 3H, $H-1''$), 0.06 (s, 3H, $H-1''$), 0.89 (s, 9H, $H-3''$), 1.44 (s, 9H, $H-3'$), 3.60 – 3.63 (m, 1H, $H-2$), 3.75 (br dd, $^2J_{1a,1b} = 10.4$ Hz, $^3J_{1a,2} = 2.8$ Hz, 1H, $H-1_a$), 3.92 (dd, $^2J_{1b,1a} = 10.4$ Hz, $^3J_{1b,2} = 2.9$ Hz, 1H, $H-1_b$), 4.25 – 4.27 (m, 1H, $H-3$), 5.23 (ddd, $^3J_{5a,4} = 10.6$ Hz, $^2J_{5a,5b} = 1.7$ Hz, $^4J_{5a,3} = 1.7$ Hz, 1H, $H-5_a$), 5.27 (br d, $^3J_{\text{NH},2} = 7.4$ Hz, 1H, NH),

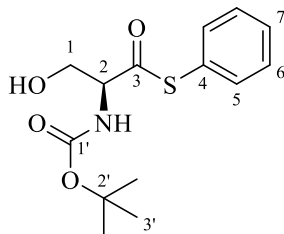
5.38 (ddd, $^3J_{5b,4} = 17.2$ Hz, $^2J_{5b,5a} = 1.7$ Hz, $^4J_{5b,3} = 1.7$ Hz, 1H, *H*-5_b), 5.92 (ddd, $^3J_{4,5b} = 17.2$ Hz, $^3J_{4,5a} = 10.6$ Hz, $^3J_{4,3} = 4.9$ Hz, 1H, *H*-4) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = -5.5$ (C-1''), -5.5 (C-1''), 18.2 (C-2''), 25.9 (3C, C-3''), 28.5 (3C, C-3'), 54.2 (C-2), 63.6 (C-1), 75.0 (C-3), 79.7 (C-2'), 116.0 (C-5), 138.0 (C-4), 155.9 (C-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{NNaO}_4\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 354.2071, gef.: 354.2078 ($|\Delta m/z| = 1.9$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[241,282,283,316,317,329]

**S-Phenyl-(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxypropanthioat /
N-Boc-L-Serin-Phenylthioester (61)**



Methode A: Zu einer Lösung aus 1.00 g (4.87 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Boc-L-Serin (**55**), 59.5 mg (487 μmol , 0.10 Äq.) DMAP und 1.00 mL (9.75 mmol, 2.00 Äq.) Thiophenol in trockenem DCM (15 mL) wurden unter Schutzgasatmosphäre innerhalb von 10 min portionsweise 1.03 g (5.36 mmol, 1.10 Äq.) EDC·HCl gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h bei RT gerührt und daraufhin mit 1 M HCl (100 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (3 x 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 3:1→2:1) gereinigt.

Methode B: Zu einer Lösung aus 2.00 g (9.75 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Boc-L-Serin (**55**), 2.00 mL (19.5 mmol, 2.00 Äq.) Thiophenol und 1.64 g (10.7 mmol, 1.10 Äq.) HOBt·H₂O in trockenem EtOAc (160 mL) und DCM (20 mL) wurde unter Schutzgasatmosphäre eine Lösung aus 2.21 g (10.7 mmol, 1.10 Äq.) DCC in trockenem EtOAc (20 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Die Mischung wurde über Celite (1 cm) und Kieselgel (1 cm) filtriert und mit EtOAc (200 mL) eluiert. Die Lösungsmittel des

Filtrats wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulen-chromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 4:1→2:1) gereinigt.

Ausbeute: *A*: 637 mg (2.14 mmol, 44 %), *B*: 1.88 g (6.33 mmol, 65 %) eines farblosen Fest-stoffs.

Summenformel: C₁₄H₁₉NO₄S (297.37 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 2:1, UV): 0.23.

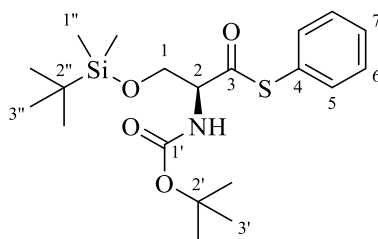
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.51 (s, 9H, *H*-3'), 2.25 (br s, 1H, *OH*), 3.83 (dd, ²*J*_{1a,1b} = 11.3 Hz, ³*J*_{1a,2} = 3.9 Hz, 1H, *H*-1_a), 4.12–4.16 (m, 1H, *H*-1_b), 4.54–4.56 (m, 1H, *H*-2), 5.64 (br d, ³*J*_{NH,2} = 8.7 Hz, 1H, *NH*), 7.39–7.43 (m, 5H, *H*-5–7) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 28.5 (3C, *C*-3'), 62.0 (*C*-2), 63.2 (*C*-1), 80.9 (*C*-2'), 127.2 (*C*-4 od. *C*-7), 129.4 (2C, *C*-5 od. *C*-6), 129.7 (*C*-4 od. *C*-7), 134.8 (2C, *C*-5 od. *C*-6), 155.6 (*C*-1'), 199.5 (*C*-3) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₄H₁₉NNaO₄S⁺ [M+Na]⁺: 320.0927, gef.: 320.0935 (|Δ*m/z*| = 2.5 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[190,240]

***S*-Phenyl-(*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)propan-thioat / 1-OTBS-*N*-Boc-*L*-Serin-Phenylthioester (34)**



Zu einer Lösung aus 200 mg (673 μmol, 1.00 Äq.) des Alkohols **61**, 152 mg (1.01 mmol, 1.50 Äq.) TBSCl und 16.4 mg (135 μmol, 0.20 Äq.) DMAP in trockenem DMF (2 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 112 μL (1.10 mmol, 1.50 Äq.) NMM gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und daraufhin mit ges. NH₄Cl-Lösung (20 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (5 x 10 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungs-

mittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 241 mg (587 μmol , 87 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{SSi}$ (411.63 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 10:1, UV): 0.36.

¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.05$ (s, 3H, *H*-1"), 0.06 (s, 3H, *H*-1"), 0.90 (s, 9H, *H*-3"), 1.52 (s, 9H, *H*-3'), 3.79 (dd, $^2J_{1a,1b} = 10.1$ Hz, $^3J_{1a,2} = 3.4$ Hz, 1H, *H*-1_a), 4.18 (dd, $^2J_{1b,1a} = 10.1$ Hz, $^3J_{1b,2} = 2.3$ Hz, 1H, *H*-1_b), 4.47 (app dt, $^3J_{2,NH} = 9.1$ Hz, $J = 2.8$ Hz, 1H, *H*-2), 5.52 (br d, $^3J_{NH,2} = 9.1$ Hz, 1H, *NH*), 7.36–7.41 (m, 5H, *H*-5–7) ppm.

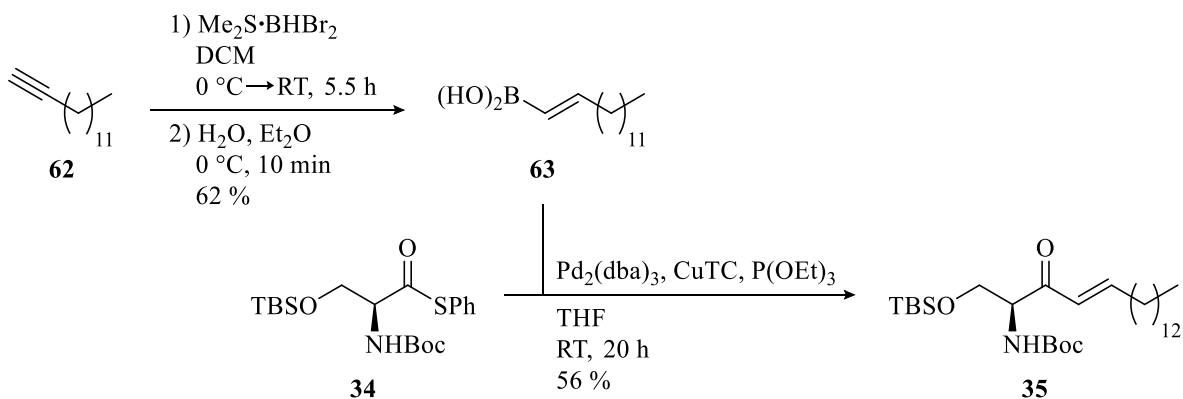
¹³C-NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = -5.4$ (*C*-1"), -5.4 (*C*-1"), 18.4 (*C*-2"), 25.9 (3C, *C*-3"), 28.5 (3C, *C*-3'), 61.9 (*C*-2), 63.7 (*C*-1), 80.6 (*C*-2'), 127.8 (*C*-4 od. *C*-7), 129.3 (2C, *C*-5 od. *C*-6), 129.5 (*C*-4 od. *C*-7), 134.8 (2C, *C*-5 od. *C*-6), 155.4 (*C*-1'), 199.4 (*C*-3) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NNaO}_4\text{SSi}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 434.1792, gef.: 434.1788 ($|\Delta m/z| = 0.8$ ppm).

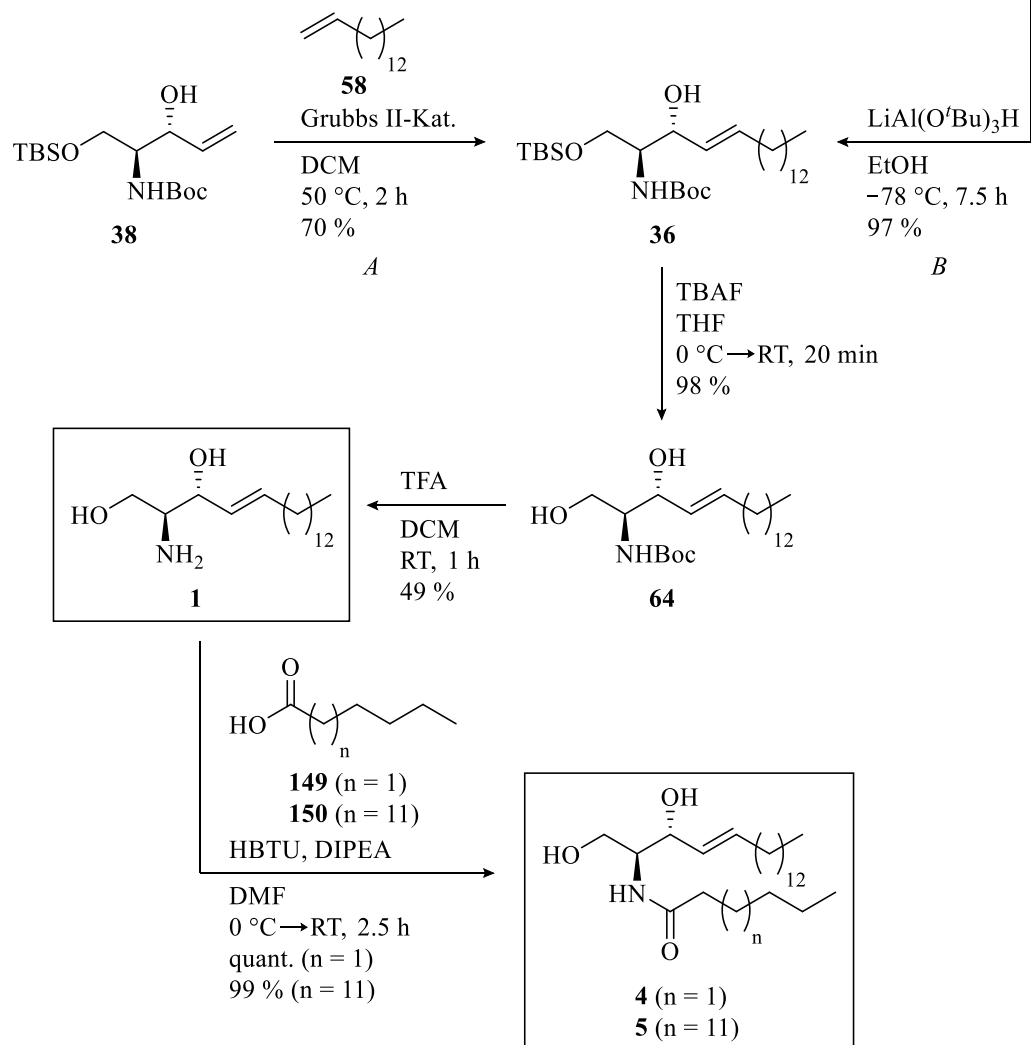
Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[190,240]

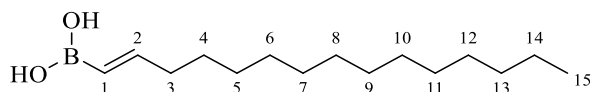
7.2.2 Synthese natürlicher Sphingolipide: Sphingosin und Ceramide

Liebeskind-Srogl-Variante:



Grubbs-Variante:



(E)-Pentadec-1-en-1-ylboronsäure (63)

Zu einer Lösung aus 1.00 mL (3.81 mmol, 1.00 Äq.) Pentadec-1-in (**62**) in trockenem DCM (10 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre innerhalb von 5 min tropfenweise 4.19 mL (1 M in DCM, 4.19 mmol, 1.10 Äq.) Me₂S·BBr₂-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 0 °C und dann 5 h bei RT gerührt. Die gelbe Lösung wurde daraufhin bei 0 °C vorsichtig mit Et₂O (5 mL) und H₂O (5 mL) versetzt und 10 min gerührt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Nach der Zugabe von H₂O (20 mL) und ges. NaHCO₃-Lösung (20 mL) wurde das Gemisch mit EtOAc (4 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 597 mg (2.35 mmol, 62 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₅H₃₁BO₂ (254.22 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 2:1, KMnO₄): 0.25.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.88 (t, ³J_{15,14} = 6.9 Hz, 3H, H-15), 1.26–1.32 (m, 20H, H-5–14), 1.42–1.49 (m, 2H, H-4), 2.18–2.24 (m, 2H, H-3), 5.53 (dt, ³J_{1,2} = 17.6 Hz, ⁴J_{1,3} = 1.5 Hz, 1H, H-1), 6.96 (dt, ³J_{2,1} = 17.6 Hz, ³J_{2,3} = 6.5 Hz, 1H, H-2) ppm.

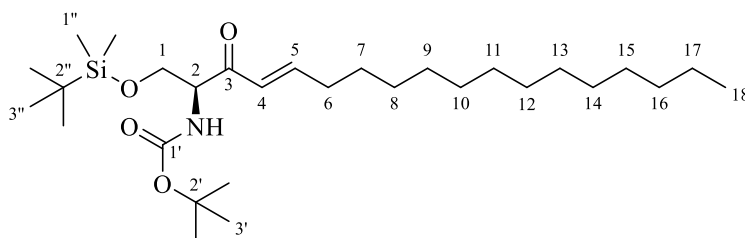
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.3 (C-15), 22.9 (C-14), 28.4 (C-4), 29.4, 29.5, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.9 (zus. 8C, C-5–12), 32.1 (C-13), 35.9 (C-3), 122.1 (C-1, schwaches Signal aufgrund des benachbarten B-Atoms), 158.0 (C-2) ppm.

¹¹B{¹H}-NMR (CDCl₃, 128 MHz): δ = 28.2 ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₁₅H₃₁BNaO₂⁺ [M+Na]⁺: 277.23093, gef.: 277.23135 (|Δm/z| = 0.51 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[190,240,485]

***tert*-Butyl(*S,E*)-(1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-oxooctadec-4-en-2-yl)carbamat /
1-OTBS-*N*-Boc-3-Ketosphingosin (35)**



Zu einer Mischung aus 50.0 mg (121 μmol , 1.00 Äq.) des Thiophenylesters **34**, 52.5 mg (206 μmol , 1.70 Äq.) der Boronsäure **63**, 3.34 mg (3.64 μmol , 0.03 Äq.) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ und 34.7 mg (182 μmol , 1.50 Äq.) Kupfer(I)-thiophen-2-carboxylat (CuTC) in trockenem THF (3 mL) wurden unter Schutzgasatmosphäre 4.17 μL (24.3 μmol , 0.20 Äq.) $\text{P}(\text{OEt})_3$ gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt und daraufhin mit EtOAc (40 mL) versetzt. Die organische Phase wurde nacheinander mit 0.1 M NaOH (5 mL), 0.1 M HCl (5 mL), ges. NaHCO_3 -Lösung (5 mL) und ges. NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 30:1) gereinigt.

Ausbeute: 34.6 mg (67.6 μmol , 56 %) eines hellgelben Öls.

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{57}\text{NO}_4\text{Si}$ (511.86 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 30:1, KMnO_4): 0.27.

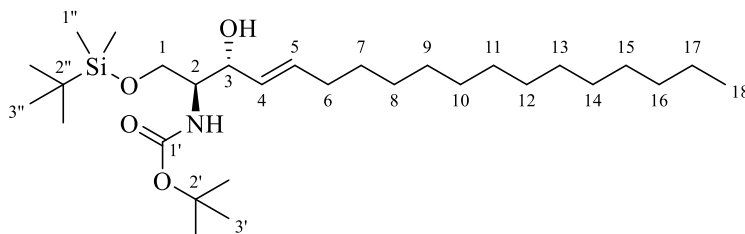
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = -0.01$ (s, 3H, $H-1''$), 0.00 (s, 3H, $H-1''$), 0.83 (s, 9H, $H-3''$), 0.87 (t, $^3J_{18,17} = 6.9$ Hz, 3H, $H-18$), 1.25–1.31 (m, 20H, $H-8-17$), 1.43–1.48 (m, 11H, $H-3'$, $H-7$), 2.18–2.24 (m, 2H, $H-6$), 3.82 (dd, $^2J_{1a,1b} = 10.2$ Hz, $^3J_{1a,2} = 4.6$ Hz, 1H, $H-1_a$), 3.96 (dd, $^2J_{1b,1a} = 10.2$ Hz, $^3J_{1b,2} = 3.4$ Hz, 1H, $H-1_b$), 4.51–4.55 (m, 1H, $H-2$), 5.53 (br d, $^3J_{\text{NH},2} = 7.6$ Hz, 1H, NH), 6.26 (d, $^3J_{4,5} = 15.7$ Hz, 1H, $H-4$), 6.96 (dt, $^3J_{5,4} = 15.7$ Hz, $^3J_{5,6} = 7.0$ Hz, 1H, $H-5$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = -5.5$ (C-1''), -5.4 (C-1''), 14.3 (C-18), 18.3 (C-2''), 22.8 (C-17), 25.9 (3C, C-3''), 28.1 (C-7), 28.5 (3C, C-3'), 29.3, 29.5, 29.5, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 8C, C-8–15), 32.1 (C-16), 32.8 (C-6), 59.6 (C-2), 63.8 (C-1), 79.7 (C-2'), 127.0 (C-4), 149.4 (C-5), 155.5 (C-1'), 196.6 (C-3) ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{57}\text{NNaO}_4\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 534.3949, gef.: 534.3957 ($|\Delta m/z| = 1.4$ ppm); m/z ber. für $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{N}_2\text{NaO}_8\text{Si}_2^+$ $[2\text{M}+\text{Na}]^+$: 1045.8006, gef.: 1045.8019 ($|\Delta m/z| = 1.2$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[190,240]

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxyoctadec-4-en-2-yl)-
carbamat / 1-OTBS-*N*-Boc-Sphingosin (**36**)**



Methode A: Zu einer Lösung aus 1.53 g (4.60 mmol, 1.00 Äq.) des Allylalkohols **38** und 5.00 mL (18.4 mmol, 4.00 Äq.) Pentadecen (**58**) in trockenem DCM (25 mL) wurden unter Schutzgasatmosphäre 117 mg (138 μ mol, 0.03 Äq.) Grubbs II-Kat. gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 50 °C gerührt, das Lösungsmittel daraufhin unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:0→8:1) gereinigt.

Methode B: Zu einer Lösung aus 1.59 g (3.11 mmol, 1.00 Äq.) des Ketons **35** in EtOH (50 mL) wurden bei -78 °C innerhalb von 6 h portionsweise 3.15 g (2.88 mmol, 2.20 Äq.) LiAl(O*t*Bu)₃H gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h bei -78 °C gerührt und daraufhin mit 0.1 M HCl (100 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 80 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) und ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 30:1→20:1) gereinigt.

Ausbeute: A: 1.66 g (3.23 mmol, 70 %), B: 1.56 g (3.03 mmol, 97 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₉H₅₉NO₄Si (513.88 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 8:1, KMnO₄): 0.33.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.06 (s, 3H, *H*-1''), 0.07 (s, 3H, *H*-1''), 0.87 (t, ³*J*_{18,17} = 7.0 Hz, 3H, *H*-18), 0.89 (s, 9H, *H*-3''), 1.25–1.31 (m, 20H, *H*-8–17), 1.33–1.38 (m, 2H, *H*-7), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 2.02–2.07 (m, 2H, *H*-6), 3.33 (br d, ³*J*_{OH,3} = 8.2 Hz, 1H, OH), 3.55–3.58 (m, 1H, *H*-2), 3.75 (br dd, ²*J*_{1a,1b} = 10.3 Hz, ³*J*_{1a,2} = 2.6 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.93 (dd, ²*J*_{1b,1a} = 10.3 Hz,

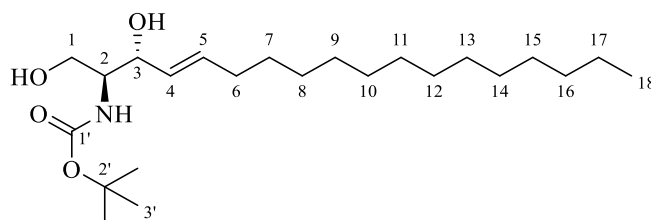
$^3J_{1b,2} = 3.0$ Hz, 1H, $H-1_b$), 4.16–4.21 (m, 1H, $H-3$), 5.24 (br d, $^3J_{NH,2} = 8.2$ Hz, 1H, NH), 5.50 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.3$ Hz, $^3J_{4,3} = 5.9$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.3$ Hz, 1H, $H-4$), 5.75 (dtd, $^3J_{5,4} = 15.3$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.8$ Hz, $^4J_{5,3} = 1.4$ Hz, 1H, $H-5$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = -5.5$ ($C-1''$), -5.5 ($C-1''$), 14.3 ($C-18$), 18.3 ($C-2''$), 22.8 ($C-17$), 26.0 (3C, $C-3''$), 28.5 (3C, $C-3'$), 29.3 ($C-7$), 29.5, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 8C, $C-8-15$), 32.1 ($C-16$), 32.5 ($C-6$), 54.6 ($C-2$), 63.6 ($C-1$), 74.8 ($C-3$), 79.6 ($C-2'$), 129.6 ($C-4$), 133.2 ($C-5$), 155.9 ($C-1'$) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{59}\text{NNaO}_4\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 536.41056, gef.: 536.41152 ($|\Delta m/z| = 1.79$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[240,241,316,317]

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)carbammat / *N*-Boc-Sphingosin (64)**



Zu einer Lösung aus 431 mg (839 μmol , 1.00 Äq.) des Silylethers **36** in trockenem THF (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 923 μL (1 M in THF, 923 μmol , 1.10 Äq.) TBAF-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei RT gerührt und daraufhin mit H_2O (15 mL) und ges. NH_4Cl -Lösung (10 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (4 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl -Lösung (15 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 327 mg (818 μmol , 98 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NO}_4$ (399.62 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 2:1, KMnO_4): 0.22.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.87$ (t, $^3J_{18,17} = 6.9$ Hz, 3H, $H-18$), 1.25–1.31 (m, 20H, $H-8-17$), 1.33–1.38 (m, 2H, $H-7$), 1.44 (s, 9H, $H-3'$), 2.02–2.07 (m, 2H, $H-6$), 2.79 (br s, 2H, 2 x OH), 3.58–3.61 (m, 1H, $H-2$), 3.69 (dd, $^2J_{1a,1b} = 11.4$ Hz, $^3J_{1a,2} = 3.7$ Hz, 1H, $H-1_a$), 3.92

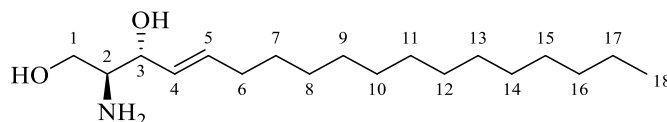
(dd, $^2J_{1b,1a} = 11.4$ Hz, $^3J_{1b,2} = 3.7$ Hz, 1H, *H*-1_b), 5.32 (br d, $^3J_{NH,2} = 7.3$ Hz, 1H, *NH*), 4.28–4.31 (m, 1H, *H*-3), 5.52 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.3$ Hz, $^3J_{4,3} = 6.5$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.3$ Hz, 1H, *H*-4), 5.77 (dtd, $^3J_{5,4} = 15.3$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.8$ Hz, $^4J_{5,3} = 1.2$ Hz, 1H, *H*-5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 14.3$ (*C*-18), 22.8 (*C*-17), 28.5 (3C, *C*-3'), 29.2 (*C*-7), 29.3, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8 (zus. 8C, *C*-8–15), 32.1 (*C*-16), 32.4 (*C*-6), 55.5 (*C*-2), 62.8 (*C*-1), 74.9 (*C*-3), 79.9 (*C*-2'), 129.0 (*C*-4), 134.3 (*C*-5), 156.4 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NNaO}_4^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 422.32408, gef.: 422.32435 ($|\Delta m/z| = 0.64$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[241,316,317,470]

(2*S*,3*R*,*E*)-2-Aminooctadec-4-en-1,3-diol / Sphingosin (1)



Zu einer Lösung aus 853 mg (2.14 mmol) des Carbamats **64** in trockenem DCM (20 mL) wurden unter Schutzgasatmosphäre 10 mL TFA gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt und daraufhin mit 1 M NaOH (130 mL) und EtOAc (6 x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH/ NEt_3 9:1:0.01) gereinigt. Das Rohprodukt wurde in H_2O (60 mL) und ges. NaCl-Lösung (60 mL) suspendiert und mit DCM (8 x 60 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (60 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 312 mg (1.04 mmol, 49 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_2$ (299.50 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (DCM/MeOH/ NEt_3 10:1:0.01, KMnO_4): 0.08.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{18,17} = 6.9$ Hz, 3H, *H*-18), 1.25–1.31 (m, 20H, *H*-8–17), 1.34–1.39 (m, 2H, *H*-7), 1.88 (br s, 4H, 2 x *OH*, *NH*₂), 2.03–2.08 (m, 2H, *H*-6),

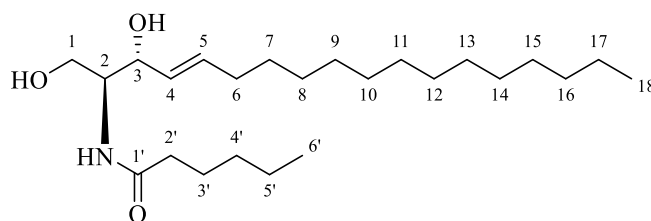
2.85–2.89 (m, 1H, *H*-2), 3.62 (dd, $^2J_{1a,1b} = 10.9$ Hz, $^3J_{1a,2} = 5.9$ Hz, 1H, *H*-1_a), 3.68 (dd, $^2J_{1b,1a} = 10.9$ Hz, $^3J_{1b,2} = 4.6$ Hz, 1H, *H*-1_b), 4.02–4.05 (m, 1H, *H*-3), 5.47 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.3$ Hz, $^3J_{4,3} = 7.2$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.4$ Hz, 1H, *H*-4), 5.76 (dtd, $^3J_{5,4} = 15.3$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.8$ Hz, $^4J_{5,3} = 0.8$ Hz, 1H, *H*-5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 14.3$ (*C*-18), 22.8 (*C*-17), 29.3 (*C*-7), 29.4, 29.5, 29.6, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 8C, *C*-8–15), 32.1 (*C*-16), 32.5 (*C*-6), 56.2 (*C*-2), 64.2 (*C*-1), 75.6 (*C*-3), 129.4 (*C*-4), 134.9 (*C*-5) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_2^+$ [*M*+*H*]⁺: 300.28971, gef.: 300.28893 ($|\Delta m/z| = 2.58$ ppm); *m/z* ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NNaO}_2^+$ [*M*+*Na*]⁺: 322.27165, gef.: 322.27025 ($|\Delta m/z| = 4.35$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[219,240,486]

N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-Dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)hexanamid / C₆-Ceramid (4)



Zu einer Lösung aus 19.4 mg (167 μmol , 1.00 Äq.) Hexansäure (**149**) in trockenem DMF (4 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 87.2 μL (501 μmol , 3.00 Äq.) DIPEA und 76.0 mg (200 μmol , 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei 0 °C und dann 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 50.0 mg (167 μmol , 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenes DMF (4 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt und daraufhin mit ges. NH_4Cl -Lösung (50 mL) und H_2O (5 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (6 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl -Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 66.3 mg (167 μmol , quant.) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{NO}_3$ (397.64 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1, KMnO_4): 0.15.

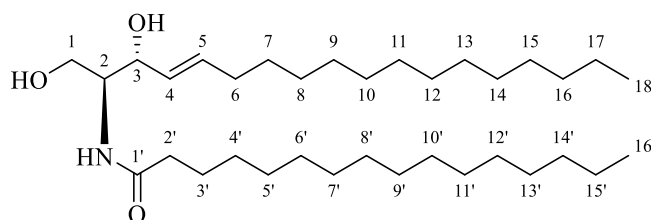
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{18,17} = 6.9$ Hz, 3H, $H-18$), 0.90 (t, $^3J_{6',5'} = 7.1$ Hz, 3H, $H-6'$), 1.25–1.38 (m, 26H, $H-7-17$, $H-4'-5'$), 1.61–1.68 (m, 2H, $H-3'$), 2.05 (app q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $H-6$), 2.23 (t, $^3J_{2',3'} = 7.6$ Hz, 2H, $H-2'$), 2.44 (br s, 2H, 2 x OH), 3.70 (dd, $^2J_{1a,1b} = 11.1$ Hz, $^3J_{1a,2} = 3.2$ Hz, 1H, $H-1_a$), 3.88–3.93 (m, 1H, $H-2$), 3.96 (dd, $^2J_{1b,1a} = 11.1$ Hz, $^3J_{1b,2} = 3.8$ Hz, 1H, $H-1_b$), 4.31–4.33 (m, 1H, $H-3$), 5.53 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.4$ Hz, $^3J_{4,3} = 6.4$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.4$ Hz, 1H, $H-4$), 5.78 (dtd, $^3J_{5,4} = 15.4$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.8$ Hz, $^4J_{5,3} = 1.1$ Hz, 1H, $H-5$), 6.27 (br d, $^3J_{NH,2} = 7.4$ Hz, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 14.1$ ($C-18$ od. $C-6'$), 14.3 ($C-18$ od. $C-6'$), 22.5 ($C-5'$), 22.8 ($C-17$), 25.6 ($C-3'$), 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 9C, $C-7-15$), 31.5 ($C-4'$), 32.0 ($C-16$), 32.4 ($C-6$), 36.9 ($C-2'$), 54.7 ($C-2$), 62.5 ($C-1$), 74.5 ($C-3$), 128.9 ($C-4$), 134.3 ($C-5$), 174.2 ($C-1'$) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{NNaO}_3^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 420.34482, gef.: 420.34499 ($|\Delta m/z| = 0.42$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[359]

N-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-Dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)palmitamid / C₁₆-Ceramid (5)



Zu einer Lösung aus 42.8 mg (167 μmol , 1.00 Äq.) Hexadecansäure (**150**) in trockenem DMF (6 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 87.2 μL (501 μmol , 3.00 Äq.) DIPEA und 76.0 mg (200 μmol , 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei 0 °C und dann 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 50.0 mg (167 μmol , 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenes DMF (4 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt und daraufhin mit ges. NH_4Cl -Lösung (50 mL) und H_2O (5 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (6 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl -Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 88.7 mg (165 μmol , 99 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $C_{34}H_{67}NO_3$ (537.91 $g \cdot mol^{-1}$).

R_f (CHCl₃/MeOH 20:1, KMnO₄): 0.17.

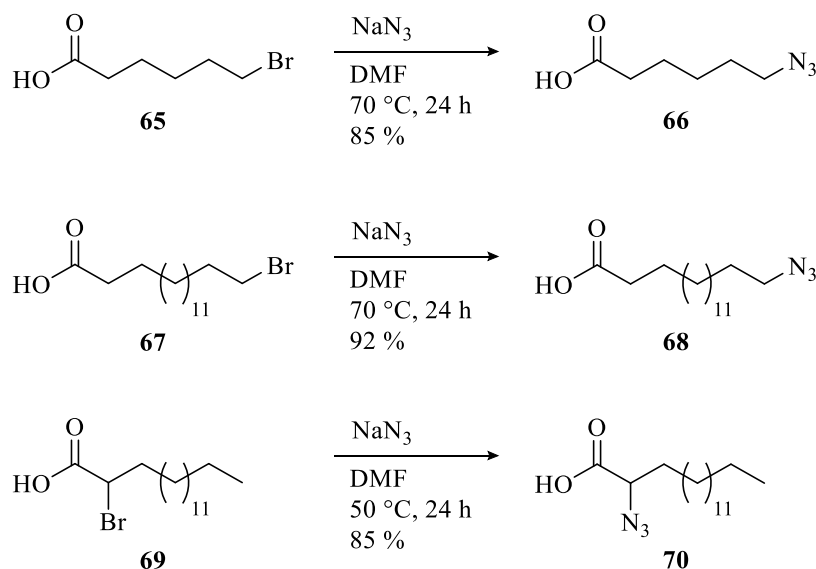
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{18,17/16',15'} = 6.8$ Hz, 6H, *H*-18, *H*-16'), 1.25–1.38 (m, 46H, *H*-7–17, *H*-4'–15'), 1.60–1.67 (m, 2H, *H*-3'), 2.05 (app q, $J = 7.1$ Hz, 2H, *H*-6), 2.23 (t, $^3J_{2',3'} = 7.6$ Hz, 2H, *H*-2'), 2.34 (br s, 2H, 2 x OH), 3.70 (dd, $^2J_{1a,1b} = 11.2$ Hz, $^3J_{1a,2} = 3.2$ Hz, 1H, *H*-1_a), 3.88–3.93 (m, 1H, *H*-2), 3.96 (dd, $^2J_{1b,1a} = 11.2$ Hz, $^3J_{1b,2} = 3.8$ Hz, 1H, *H*-1_b), 4.31–4.33 (m, 1H, *H*-3), 5.53 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.4$ Hz, $^3J_{4,3} = 6.5$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.3$ Hz, 1H, *H*-4), 5.78 (dtd, $^3J_{5,4} = 15.4$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.7$ Hz, $^4J_{5,3} = 1.0$ Hz, 1H, *H*-5), 6.25 (br d, $^3J_{NH,2} = 7.2$ Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 14.3$ (2C, *C*-18, *C*-16'), 22.8 (*C*-17), 25.9 (*C*-3'), 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 19C, *C*-7–15, *C*-4'–13'), 32.1 (2C, *C*-16, *C*-14'), 32.4 (*C*-6), 37.0 (*C*-2'), 54.6 (*C*-2), 62.6 (*C*-1), 74.8 (*C*-3), 128.9 (*C*-4), 134.5 (*C*-5), 174.1 (*C*-1') ppm.

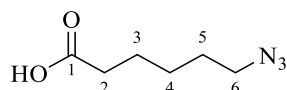
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $C_{34}H_{67}NNaO_3^+$ [M+Na]⁺: 560.50132, gef.: 560.50225 ($|\Delta m/z| = 1.66$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[203,221,241]

7.2.3 Synthese von azidfunktionalisierten Carbonsäuren



6-Azidohexansäure (66)



Zu einer Lösung aus 2.00 g (10.3 mmol, 1.00 Äq.) 6-Bromhexansäure (**65**) in DMF (40 mL) wurden 2.00 g (30.8 mmol, 3.00 Äq.) NaN_3 gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei 70 °C gerührt und daraufhin bei RT mit 1 M HCl (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 40 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.38 g (8.75 mmol, 85 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ ($157.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 4:1, KMnO_4): 0.26.

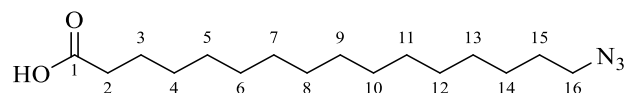
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.39\text{--}1.47$ (m, 2H, *H*-4), 1.58–1.71 (m, 4H, *H*-3, *H*-5), 2.38 (t, $^3J_{2,3} = 7.4$ Hz, 2H, *H*-2), 3.28 (t, $^3J_{6,5} = 6.9$ Hz, 2H, *H*-6), 10.99 (br s, 1H, CO_2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 24.3$ (*C*-3), 26.3 (*C*-4), 28.7 (*C*-5), 34.0 (*C*-2), 51.3 (*C*-6), 180.0 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $C_6H_{11}N_3NaO_2^+$ $[M+Na]^+$: 180.07435, gef.: 180.07380 ($|\Delta m/z| = 3.01$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[281,487]

16-Azidohexadecansäure (68)



Zu einer Lösung aus 1.38 g (4.12 mmol, 1.00 Äq.) 16-Bromhexadecansäure (67) in DMF (40 mL) wurden 803 mg (12.3 mmol, 3.00 Äq.) NaN_3 gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei 70 °C gerührt und daraufhin bei RT mit 1 M HCl (60 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 40 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.13 g (3.79 mmol, 92 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $C_{16}H_{31}N_3O_2$ (297.44 $g \cdot mol^{-1}$).

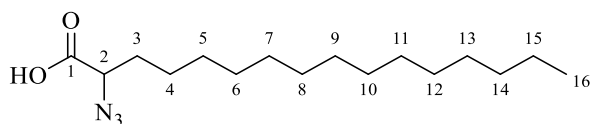
R_f (Cy/EtOAc 4:1, $KMnO_4$): 0.33.

¹H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): $\delta = 1.25\text{--}1.37$ (m, 22H, *H*-4–14), 1.56–1.66 (m, 4H, *H*-3, *H*-15), 2.34 (t, $^3J_{2,3} = 7.5$ Hz, 2H, *H*-2), 3.25 (t, $^3J_{16,15} = 7.0$ Hz, 2H, *H*-16), 11.53 (br s, 1H, CO_2H) ppm.

¹³C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): $\delta = 24.8$ (*C*-3), 26.9 (*C*-14), 29.0 (*C*-15), 29.2, 29.3, 29.4, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 10C, *C*-4–13), 34.2 (*C*-2), 51.6 (*C*-16), 180.3 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $C_{16}H_{31}N_3NaO_2^+$ $[M+Na]^+$: 320.23085, gef.: 320.23018 ($|\Delta m/z| = 2.08$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[281,488]

2-Azidohexadecansäure (70)

Zu einer Lösung aus 1.00 g (2.98 mmol, 1.00 Äq.) 2-Bromhexadecansäure (**69**) in DMF (25 mL) wurden 582 mg (8.95 mmol, 3.00 Äq.) NaN_3 gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei 50 °C gerührt und daraufhin bei RT mit H_2O (50 mL) und 1 M HCl (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 40 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 755 mg (2.54 mmol, 85 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$ (297.44 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 4:1, KMnO_4): 0.17.

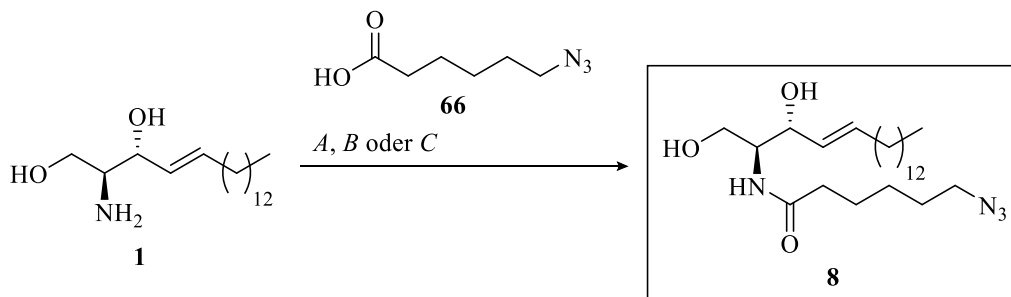
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{16,15} = 6.9$ Hz, 3H, *H*-16), 1.26–1.32 (m, 22H, *H*-5–15), 1.40–1.50 (m, 2H, *H*-4), 1.76–1.94 (m, 2H, *H*-3), 3.89 (br dd, $^3J_{2,3a} = 8.0$ Hz, $^3J_{2,3b} = 5.2$ Hz, 1H, *H*-2), 10.71 (br s, 1H, CO_2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 14.3$ (*C*-16), 22.8 (*C*-15), 25.8 (*C*-4), 29.1, 29.5, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 9C, *C*-5–13), 31.4 (*C*-3), 32.1 (*C*-14), 61.9 (*C*-2), 177.1 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI^+): *m/z* ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{NaO}_2^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 320.23085, gef.: 320.23058 ($|\Delta m/z| = 0.84$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[281]

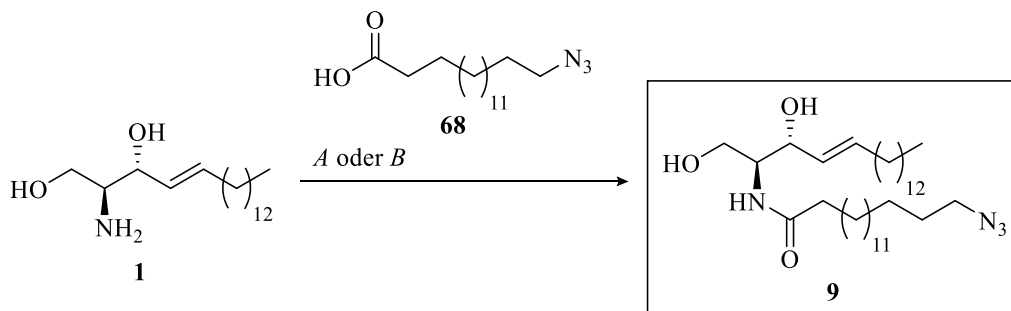
7.2.4 Synthese von Ceramiden mit azidfunktionalisierten Seitenketten



A:
EDC·HCl, HOBt·H₂O, DIPEA
DCM
0 °C, 2 h
dann RT, 2 d
56 %

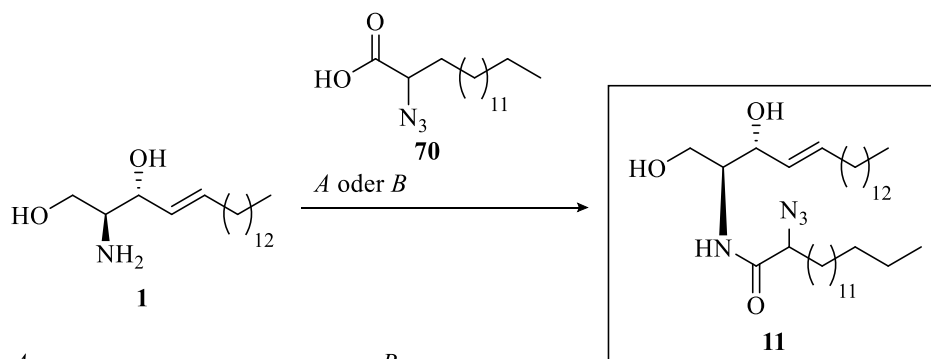
B:
HATU, DIPEA
DCM
0 °C → RT, 19 h
66 %

C:
HBTU, DIPEA
DMF
0 °C → RT, 2 h
77 %



A:
EDC·HCl, HOBt·H₂O, DIPEA
DCM
0 °C, 1.5 h
dann RT, 20 h
95 %

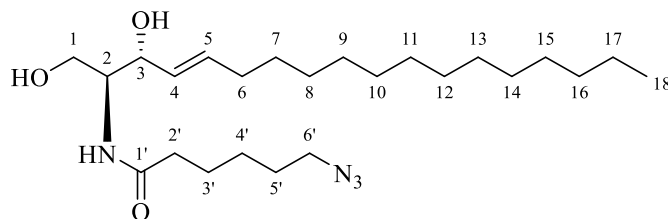
B:
HBTU, DIPEA
DMF
0 °C → RT, 2 h
99 %



A:
EDC·HCl, HOBt·H₂O, DIPEA
DCM
0 °C, 1.5 h
dann RT, 20 h
66 %

B:
HBTU, DIPEA
DMF
0 °C → RT, 1.5 h
89 %

**6-Azido-*N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)hexanamid /
 ω -N₃-C₆-Ceramid (8)**



Methode A: Zu einer Lösung aus 50.0 mg (167 μ mol, 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und 38.4 mg (200 μ mol, 1.20 Äq.) EDC·HCl in trockenem DCM (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 30.7 mg (200 μ mol, 1.20 Äq.) HOBt·H₂O und 87.2 μ L (501 μ mol, 3.00 Äq.) DIPEA gegeben. Das Gemisch wurde bei 0 °C innerhalb von 2 h tropfenweise mit einer Lösung aus 26.2 mg (167 μ mol, 1.00 Äq.) der Azidosäure **66** in trockenem DCM (5 mL) versetzt und daraufhin 2 d bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Methode B: Zu einer Lösung aus 25.0 mg (83.5 μ mol, 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und 13.1 mg (83.5 μ mol, 1.00 Äq.) der Azidosäure **66** in trockenem DCM (10 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 43.6 μ L (250 μ mol, 3.00 Äq.) DIPEA und 38.1 mg (100 μ mol, 1.20 Äq.) HATU gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei RT gerührt und daraufhin mit 1 M HCl (20 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (4 x 10 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Methode C: Zu einer Lösung aus 26.2 mg (167 μ mol, 1.00 Äq.) der Azidosäure **66** in trockenem DMF (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 87.2 μ L (501 μ mol, 3.00 Äq.) DIPEA und 76.0 mg (200 μ mol, 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 15 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 50.0 mg (167 μ mol, 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenem DMF (4 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt und daraufhin mit ges. NH₄Cl-Lösung (50 mL) und H₂O (5 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (6 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand zweimal säulenchromatographisch an Kieselgel (1. CHCl₃/MeOH 20:1, 2. CHCl₃/MeOH 40:1) gereinigt.

Ausbeute: A: 41.0 mg (935 μmol , 56 %), B: 24.2 mg (55.2 μmol , 66 %), C: 56.2 mg (128 μmol , 77 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_3$ (438.66 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (EtOAc, KMnO_4): 0.38.

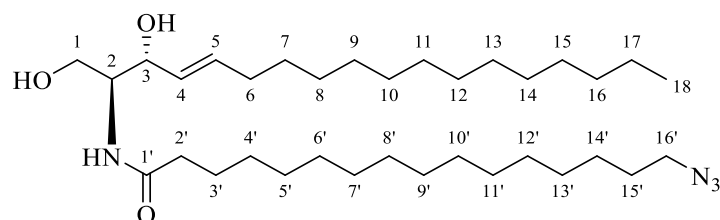
¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{18,17} = 6.9$ Hz, 3H, H-18), 1.25–1.31 (m, 20H, H-8–17), 1.35–1.46 (m, 4H, H-7, H-4'), 1.59–1.72 (m, 4H, H-5', H-3'), 2.05 (app br q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-6), 2.25 (t, $^3J_{2',3'} = 7.5$ Hz, 2H, H-2'), 2.47 (br s, 2H, 2 x OH), 3.28 (t, $^3J_{6',5'} = 6.8$ Hz, 2H, H-6'), 3.70 (dd, $^2J_{1a,1b} = 11.3$ Hz, $^3J_{1a,2} = 3.3$ Hz, 1H, H-1a), 3.88–3.93 (m, 1H, H-2), 3.96 (dd, $^2J_{1b,1a} = 11.3$ Hz, $^3J_{1b,2} = 3.7$ Hz, 1H, H-1b), 4.31–4.34 (m, 1H, H-3), 5.53 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.4$ Hz, $^3J_{4,3} = 6.4$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.3$ Hz, 1H, H-4), 5.79 (dtd, $^3J_{5,4} = 15.4$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.8$ Hz, $^4J_{5,3} = 1.0$ Hz, 1H, H-5), 6.30 (d, $^3J_{\text{NH},2} = 7.5$ Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl_3 , 150 MHz): $\delta = 14.3$ (C-18), 22.8 (C-17), 25.3 (C-3'), 26.4 (C-4'), 28.7 (C-5'), 29.3 (C-7), 29.4, 29.5, 29.6, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 8C, C-8–15), 32.1 (C-16), 32.4 (C-6), 36.6 (C-2'), 51.4 (C-6'), 54.5 (C-2), 62.5 (C-1), 74.8 (C-3), 128.9 (C-4), 134.4 (C-5), 173.5 (C-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{NaO}_3^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 461.34621, gef.: 461.34596 ($|\Delta m/z| = 0.54$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[281]

16-Azido-N-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)hexadecanamid / ω -N₃-C₁₆-Ceramid (9)



Methode A: Zu einer Lösung aus 25.0 mg (83.5 μmol , 1.00 Äq.) Sphingosin (1) und 19.2 mg (100 μmol , 1.20 Äq.) EDC·HCl in trockenem DCM (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 15.3 mg (100 μmol , 1.20 Äq.) HOBt·H₂O und 26.2 μL (150 μmol , 1.80 Äq.) DIPEA gegeben. Das Gemisch wurde bei 0 °C innerhalb von 1.5 h tropfenweise mit einer Lösung aus 24.8 mg (83.5 μmol , 1.00 Äq.) der Azidosäure 68 in trockenem DCM (5 mL)

versetzt und daraufhin 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Methode B: Zu einer Lösung aus 49.7 mg (167 μmol , 1.00 Äq.) der Azidosäure **68** in trockenem DMF (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 87.2 μL (501 μmol , 3.00 Äq.) DIPEA und 76.0 mg (200 μmol , 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 15 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 50.0 mg (167 μmol , 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenem DMF (4 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt und daraufhin mit ges. NH_4Cl -Lösung (50 mL) und H_2O (5 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (6 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl -Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 40:1) gereinigt.

Ausbeute: A: 46.1 mg (79.6 μmol , 95 %), B: 95.4 mg (165 μmol , 99 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_3$ (578.93 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (EtOAc, KMnO_4): 0.53.

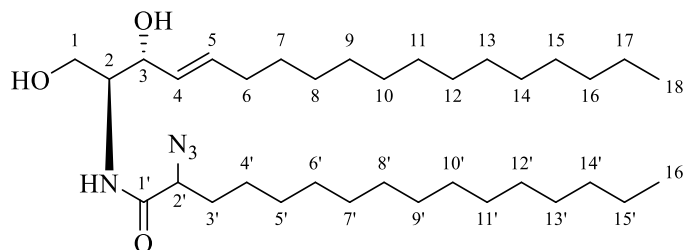
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 0.81 (t, $^3J_{18,17}$ = 6.9 Hz, 3H, H-18), 1.19–1.31 (m, 44H, H-7–17, H-4'–14'), 1.49–1.61 (m, 4H, H-3', H-15'), 1.99 (app br q, J = 7.1 Hz, 2H, H-6), 2.16 (t, $^3J_{2,3'}$ = 7.6 Hz, 2H, H-2'), 2.60 (br s, 2H, 2 x OH), 3.19 (t, $^3J_{16',15'}$ = 7.0 Hz, 2H, H-16'), 3.64 (dd, $^2J_{1a,1b}$ = 11.2 Hz, $^3J_{1a,2}$ = 3.2 Hz, 1H, H-1_a), 3.82–3.86 (m, 1H, H-2), 3.90 (dd, $^2J_{1b,1a}$ = 11.2 Hz, $^3J_{1b,2}$ = 3.7 Hz, 1H, H-1_b), 4.24–4.27 (m, 1H, H-3), 5.46 (ddt, $^3J_{4,5}$ = 15.4 Hz, $^3J_{4,3}$ = 6.4 Hz, $^4J_{4,6}$ = 1.3 Hz, 1H, H-4), 5.72 (dtd, $^3J_{5,4}$ = 15.4 Hz, $^3J_{5,6}$ = 6.7 Hz, $^4J_{5,3}$ = 1.0 Hz, 1H, H-5), 6.17 (d, $^3J_{\text{NH},2}$ = 7.4 Hz, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 14.3 (C-18), 22.8 (C-17), 25.9 (C-3'), 26.9 (C-14'), 29.0 (C-15'), 29.3, 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 19C, C-7–15, C-4'–13'), 32.1 (C-16), 32.4 (C-6), 37.0 (C-2'), 51.6 (C-16'), 54.6 (C-2), 62.6 (C-1), 74.8 (C-3), 128.9 (C-4), 134.4 (C-5), 174.1 (C-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{NaO}_3^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 601.50271, gef.: 601.50316 ($|\Delta m/z|$ = 0.75 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[281,488]

**2-Azido-*N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)hexadecanamid /
 α -N₃-C₁₆-Ceramid (11)**



Methode A: Zu einer Lösung aus 25.0 mg (83.5 μ mol, 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und 19.2 mg (100 μ mol, 1.20 Äq.) EDC·HCl in trockenem DCM (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 15.3 mg (100 μ mol, 1.20 Äq.) HOBt·H₂O und 26.2 μ L (150 μ mol, 1.80 Äq.) DIPEA gegeben. Das Gemisch wurde bei 0 °C innerhalb von 1.5 h tropfenweise mit einer Lösung aus 24.8 mg (83.5 μ mol, 1.00 Äq.) der Azidosäure **70** in trockenem DCM (5 mL) versetzt und daraufhin 20 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:1) gereinigt.

Methode B: Zu einer Lösung aus 24.8 mg (83.5 μ mol, 1.00 Äq.) der Azidosäure **70** in trockenem DMF (4 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 43.6 μ L (250 μ mol, 3.00 Äq.) DIPEA und 38.0 mg (100 μ mol, 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 3 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 25.0 mg (83.5 μ mol, 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenem DMF (5 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1.5 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:1) gereinigt.

Ausbeute: A: 32.7 mg (55.3 μ mol, 66 %), B: 43.0 mg (74.3 μ mol, 89 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₃₄H₆₆N₄O₃ (578.93 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 1:1, KMnO₄): 0.55.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (2 Diastereomere) = 0.87 (t, ³J_{18,17/16,15'} = 6.9 Hz, 6H, H-18, H-16'), 1.25–1.44 (m, 46H, H-7–17, H-4'–15'), 1.77–1.87 (m, 1H, H-3'a), 1.88–1.96 (m, 1H, H-3'b), 2.02–2.08 (m, 2H, H-6), 2.67 (br s, 1H, C-3-OH), 2.75 (br s, 1H, C-1-OH), 3.67–3.73 (m, 1H, H-1a), 3.85–3.91 (m, 1H, H-2), 3.95–4.00 (m, 2H, H-1b, H-2'), 4.28–4.34 (m, 1H, H-3), 5.48–5.55 (m, 1H, H-4), 5.75–5.84 (m, 1H, H-5), 7.01 (d, ³J_{NH,2} = 7.9 Hz, 1H, NH) ppm.

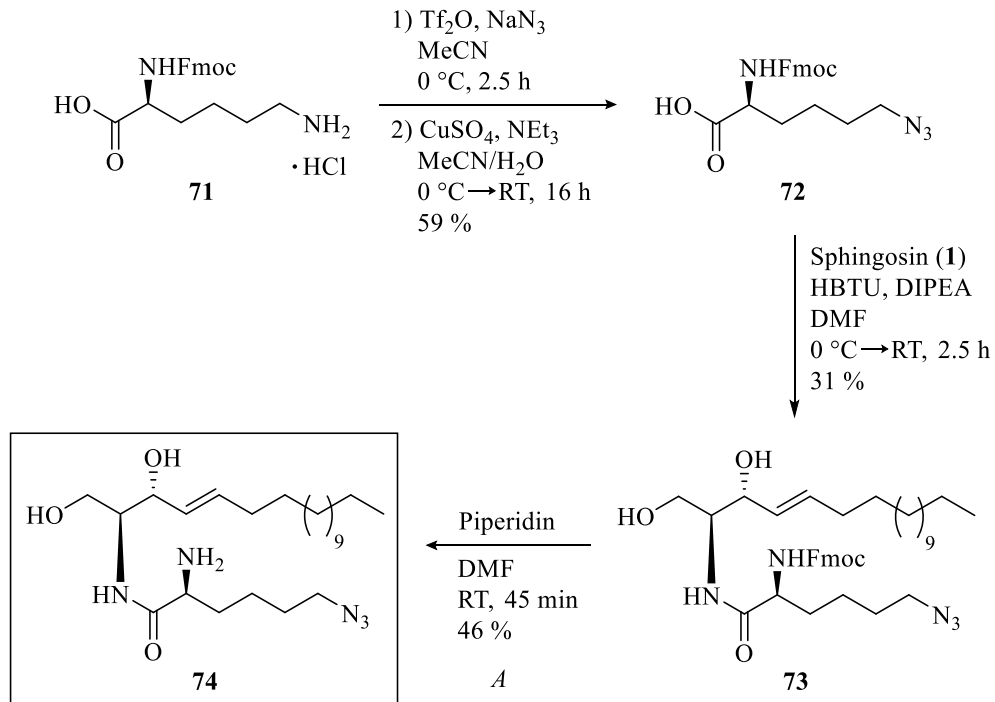
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ (2 Diastereomere) = 14.3 (2C, C-18, C-16'), 22.8 (2C, C-17, C-15'), 25.5/25.5 (C-4'), 29.2, 29.3, 29.4, 29.4, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 18C, C-7–15, C-5'–13'), 32.1 (2C, C-16, C-14'), 32.4 (2C, C-3', C-6), 54.6/54.7 (C-2), 62.3/62.3 (C-1), 64.5/64.5 (C-2'), 74.3/74.4 (C-3), 128.6/128.7 (C-4), 134.9 (C-5), 170.1/170.2 (C-1') ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{NaO}_3^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 601.50271, gef.: 601.50271 ($|\Delta m/z| = 0.01$ ppm).

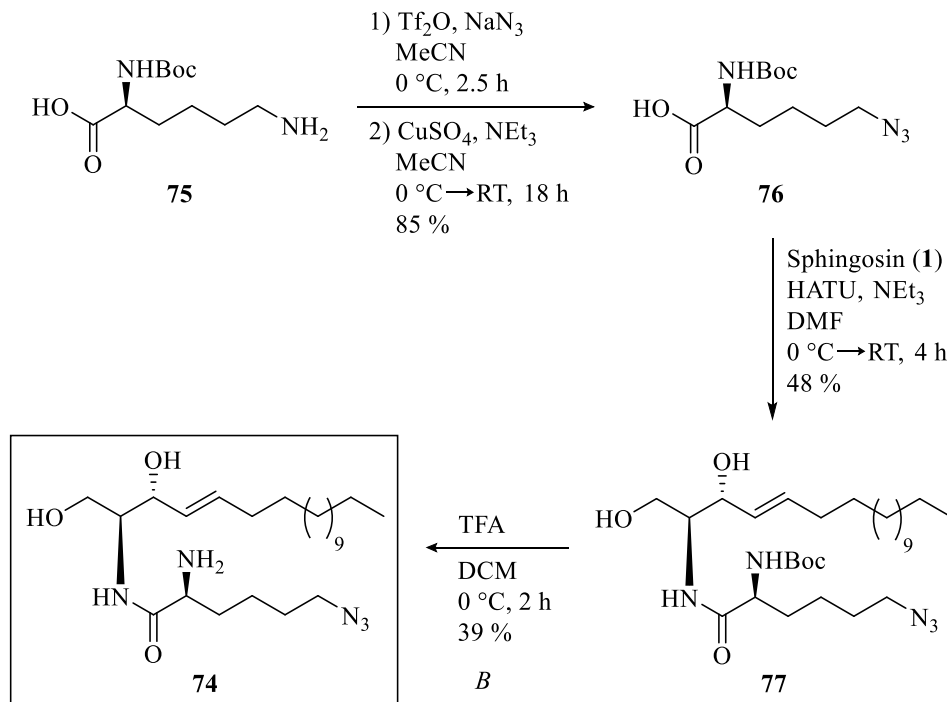
Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[281]

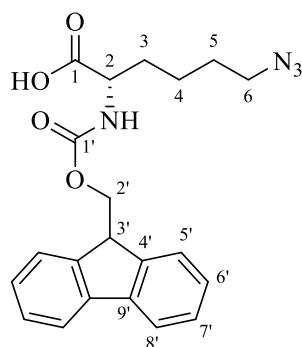
7.2.5 Synthese des bifunktionellen Amino(azido)ceramids

Fmoc-Variante:



Boc-Variante:



***N*²-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*N*⁶-diazido-L-lysin / ω -N₃-*N*-Fmoc-L-Lysin (72)**

Zu einer Suspension aus 116 mg (1.79 mmol, 1.44 Äq.) NaN₃ in MeCN (2.2 mL) wurden bei 0 °C tropfenweise 250 μ L (1.49 mmol, 1.20 Äq.) Tf₂O gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h bei 0 °C gerührt. Die dabei entstandene Lösung wurde daraufhin bei 0 °C zu einer Mischung aus 500 mg (1.24 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Fmoc-L-Lysin·HCl (**71**), 519 μ L (3.72 mmol, 3.00 Äq.) NEt₃ und 3.10 mg (12.4 μ mol, 0.01 Äq.) CuSO₄·5 H₂O in MeCN (4 mL) und H₂O (2 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt und dann mit 1 M HCl (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (4 x 40 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 40:1) gereinigt.

Ausbeute: 287 mg (728 μ mol, 59 %) eines farblosen, klebrigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₁H₂₂N₄O₄ (394.43 g·mol⁻¹).

R_f (DCM/MeOH 9:1, UV): 0.64.

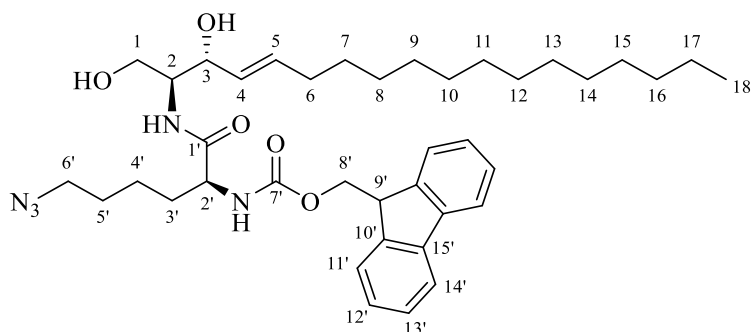
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (2 Rotamere) = 1.26–1.88 (m, 6H, *H*-3–5), 3.90–4.00, 4.37–4.40 (jeweils m, zus. 1H, *H*-2), 4.22 (t, ³*J*_{3',2'} = 6.9 Hz, 1H, *H*-3'), 4.43 (d, ³*J*_{2',3'} = 6.9 Hz), 4.54–4.55 (m, zus. 2H, *H*-2'), 5.34 (d, ³*J*_{NH,2} = 8.2 Hz), 6.28 (br d, ³*J*_{NH,2} = 6.1 Hz, zus. 1H, NH), 7.31 (dd, ³*J*_{6',5'} = 7.4 Hz, ³*J*_{6',7'} = 7.4 Hz, 2H, *H*-6'), 7.40 (dd, ³*J*_{7',6'} = 7.4 Hz, ³*J*_{7',8'} = 7.4 Hz, 2H, *H*-7'), 7.52–7.60 (m, 2H, *H*-5'), 7.77 (d, ³*J*_{8',7'} = 7.4 Hz, 2H, *H*-8'), 8.41 (br s, 1H, CO₂H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (2 Rotamere) = 22.3/22.6 (*C*-4), 28.4 (*C*-5), 31.9 (*C*-3), 47.2 (*C*-3'), 51.2 (*C*-6), 53.7/54.1 (*C*-2), 67.3/67.6 (*C*-2'), 120.2 (2C, *C*-8'), 124.7/124.8/125.2 (2C, *C*-5'), 127.2 (2C, *C*-6'), 127.9 (2C, *C*-7'), 141.5 (2C, *C*-9'), 143.6/143.6/143.7/143.8 (2C, *C*-4'), 156.3/156.9 (*C*-1'), 176.3/177.0 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₁H₂₂N₄NaO₄⁺ [M+Na]⁺: 417.1533, gef.: 417.1533 (| $\Delta m/z$ | = 0.1 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[489,490]

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl((*S*)-6-azido-1-(((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)-amino)-1-oxohexan-2-yl)carbamat / α -*N*-Fmoc- ω -N₃-C₆-Ceramid (73**)**

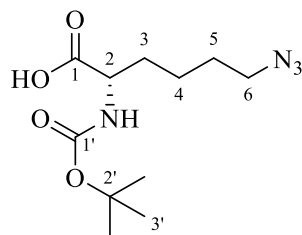


Zu einer Lösung aus 32.9 mg (83.5 μ mol, 1.00 Äq.) Azido-*N*-Fmoc-L-Lysin (**72**) in trockenem DMF (4 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 43.6 μ L (250 μ mol, 3.00 Äq.) DIPEA und 38.0 mg (100 μ mol, 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 3 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 25.0 mg (83.5 μ mol, 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenem DMF (4 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2.5 h bei RT gerührt und daraufhin mit ges. NH₄Cl-Lösung (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (3 x 40 mL) wurden die vereinigten Phasen mit ges. NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 40:1) gereinigt. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung direkt im nächsten Schritt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 17.7 mg (26.2 μ mol, 31 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₃₉H₅₇N₅O₅ (675.92 g·mol⁻¹).

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₃₉H₅₇N₅NaO₅⁺ [M+Na]⁺: 698.4252, gef.: 698.4249 (| Δ m/z| = 0.4 ppm); m/z ber. für C₇₈H₁₁₄N₁₀NaO₁₀⁺ [2M+Na]⁺: 1373.8612, gef.: 1373.8572 (| Δ m/z| = 2.9 ppm).

***N*²-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*⁶-diazio-L-lysin / ω -N₃-*N*-Boc-L-Lysin (76)**

Zu einer Suspension aus 380 mg (5.85 mmol, 1.44 Äq.) NaN₃ in MeCN (5 mL) wurden bei 0 °C tropfenweise 820 µL (4.87 mmol, 1.20 Äq.) Tf₂O gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h bei 0 °C gerührt. Die dabei entstandene Lösung wurde daraufhin bei 0 °C zu einer Mischung aus 1.00 g (4.06 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Boc-L-Lysin (**75**), 1.13 mL (8.12 mmol, 2.00 Äq.) NEt₃ und 10.1 mg (40.6 µmol, 0.01 Äq.) CuSO₄·5 H₂O in MeCN (10 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von H₂O (50 mL) und 1 M HCl (20 mL) wurde mit EtOAc (4 x 60 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 936 mg (3.44 mmol, 85 %) eines farblosen Öls, welches teilweise kristallisierte.

Summenformel: C₁₁H₂₀N₄O₄ (272.31 g·mol⁻¹).

R_f (DCM/MeOH 30:1, Ninhydrin): 0.27.

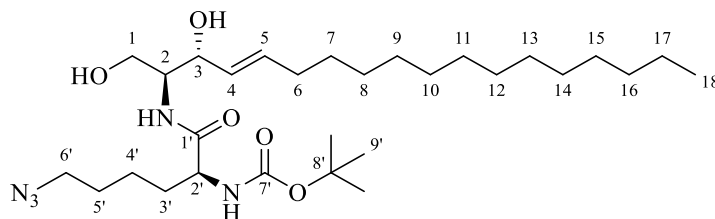
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (2 Rotamere) = 1.45 (s, 9H, *H*-3'), 1.46–1.57 (m, 2H, *H*-4), 1.57–1.66 (m, 2H, *H*-5), 1.66–1.80 (m, 1H, *H*-3_a), 1.80–1.96 (m, 1H, *H*-3_b), 3.29 (t, ³*J*_{6,5} = 6.7 Hz, 2H, *H*-6), 4.07–4.40 (m, 1H, *H*-2), 5.06, 6.55 (jeweils br d, ³*J*_{NH,2} = 8.1/5.5 Hz, zus. 1H, *NH*), 9.93 (br s, 1H, *OH*) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (2 Rotamere) = 22.7 (*C*-4), 28.4 (3C, *C*-3'), 28.5 (*C*-5), 32.0/32.2 (*C*-3), 51.2 (*C*-6), 53.3/54.5 (*C*-2), 80.6/82.1 (*C*-2'), 155.8/157.0 (*C*-1'), 176.8/177.4 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₁H₂₀N₄NaO₄⁺ [M+Na]⁺: 295.1377, gef.: 295.1383 (| $\Delta m/z$ | = 2.0 ppm); *m/z* ber. für C₂₂H₄₀N₈NaO₈⁺ [2M+Na]⁺: 567.2861, gef.: 567.2866 (| $\Delta m/z$ | = 0.8 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[491,492]

***tert*-Butyl((*S*)-6-azido-1-(((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)amino)-1-oxohexan-2-yl)carbamat / α -*N*-Boc- ω -N₃-C₆-Ceramid (77)**



Zu einer Lösung aus 45.5 mg (167 μ mol, 1.00 Äq.) Azido-*N*-Boc-L-Lysin (**76**) in trockenem DMF (3 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 69.9 μ L (501 μ mol, 3.00 Äq.) NEt₃ und 69.8 mg (184 μ mol, 1.10 Äq.) HATU gegeben. Das Gemisch wurde 20 min bei 0 °C gerührt, anschließend mit 50.0 mg (167 μ mol, 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenem DMF (3 mL) versetzt und weitere 3.5 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von H₂O (10 mL) und ges. NH₄Cl-Lösung (30 mL) wurde mit EtOAc (5 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 40:1→30:1) gereinigt.

Ausbeute: 44.1 mg (79.6 μ mol, 48 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₉H₅₅N₅O₅ (553.79 g·mol⁻¹).

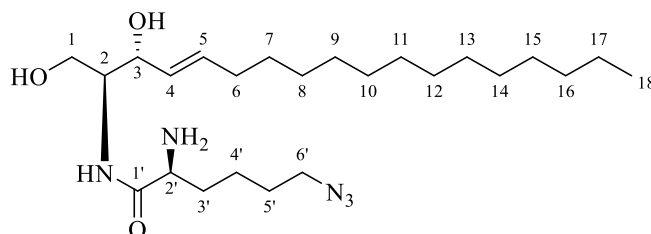
R_f (DCM/MeOH 30:1, Ninhydrin): 0.15.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.88 (t, ³J_{18,17} = 6.9 Hz, 3H, *H*-18), 1.25–1.31 (m, 20H, *H*-8–17), 1.35–1.38 (m, 2H, *H*-7), 1.44 (s, 9H, *H*-9'), 1.48–1.90 (m, 6H, *H*-3'–5'), 2.03–2.08 (m, 2H, *H*-6), 3.29 (t, ³J_{6',5'} = 6.7 Hz, 2H, *H*-6'), 3.71 (dd, ²J_{1a,1b} = 11.6 Hz, ³J_{1a,2} = 3.3 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.83–3.86 (m, 1H, *H*-2), 3.96 (dd, ²J_{1b,1a} = 11.6 Hz, ³J_{1b,2} = 3.3 Hz, 1H, *H*-1_b), 3.99–4.04 (m, 1H, *H*-2'), 4.36–4.38 (m, 1H, *H*-3), 5.07 (d, ³J_{NH,2'} = 6.9 Hz, 1H, NH), 5.51 (ddt, ³J_{4,5} = 15.4 Hz, ³J_{4,3} = 6.0 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.3 Hz, 1H, *H*-4), 5.80 (dtd, ³J_{5,4} = 15.4 Hz, ³J_{5,6} = 6.8 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.4 Hz, 1H, *H*-5), 6.86 (d, ³J_{NH,2} = 8.0 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.3 (*C*-18), 22.8 (*C*-17), 23.0 (*C*-4'), 28.4 (3C, *C*-9'), 28.6 (*C*-5'), 29.3 (*C*-7), 29.4, 29.5, 29.6, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 8C, *C*-8–15), 32.0 (2C, *C*-3', *C*-16), 32.5 (*C*-6), 51.3 (*C*-6'), 54.6 (*C*-2), 55.1 (*C*-2'), 61.9 (*C*-1), 74.0 (*C*-3), 80.7 (*C*-8'), 128.6 (*C*-4), 134.2 (*C*-5), 156.2 (*C*-7'), 172.5 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $C_{29}H_{55}N_5NaO_5^+$ $[M+Na]^+$: 576.4095, gef.: 576.4073 ($|\Delta m/z| = 3.8$ ppm); m/z ber. für $C_{58}H_{110}N_{10}NaO_{10}^+$ $[2M+Na]^+$: 1129.8299, gef.: 1129.8274 ($|\Delta m/z| = 2.2$ ppm).

(S)-2-Amino-6-azido-N-((2S,3R,E)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)hexanamid / α -NH₂- ω -N₃-C₆-Ceramid (74)



Method A: Ein Gemisch aus 15.0 mg (22.2 μ mol) des Fmoc-geschützten Lipids **73** in Piperidin/DMF (2:8, 1 mL) wurde 45 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und alle flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH/25 % NH₃ 7:1:0.1) gereinigt. Das Rohprodukt wurde in DCM (10 mL) gelöst und mit ges. NaHCO₃-Lösung (15 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (4 x 5 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Method B: Zu einer Lösung aus 37.0 mg (66.8 μ mol) des Carbamats **77** in DCM (1 mL) wurden bei 0 °C 200 μ L TFA gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 0 °C gerührt und daraufhin mit H₂O (5 mL) und 1 M NaOH (8 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 10 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH/25 % NH₃ 9:1:0.1) gereinigt. Das Rohprodukt wurde in DCM (15 mL) gelöst und mit ges. NaHCO₃-Lösung (10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (6 x 5 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: *A:* 4.60 mg (10.1 μ mol, 46 %), *B:* 11.9 mg (26.2 μ mol, 39 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $C_{24}H_{47}N_5O_3$ ($453.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/25\% \text{ NH}_3$ 9:1:0.1, Ninhydrin): 0.26.

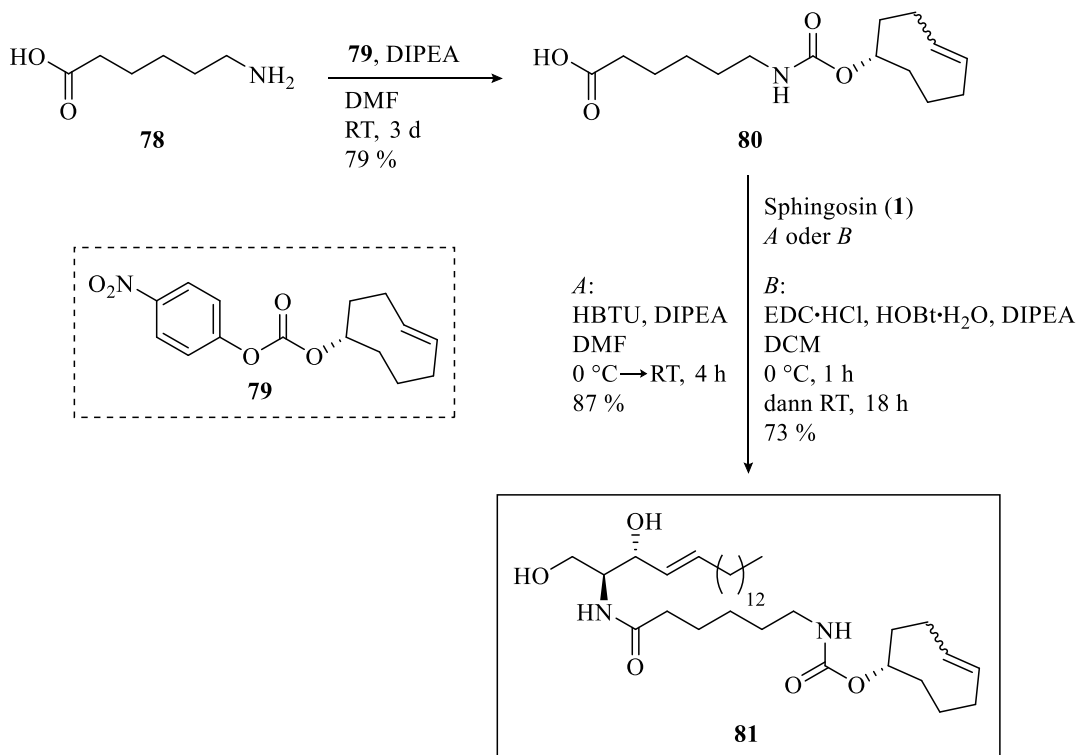
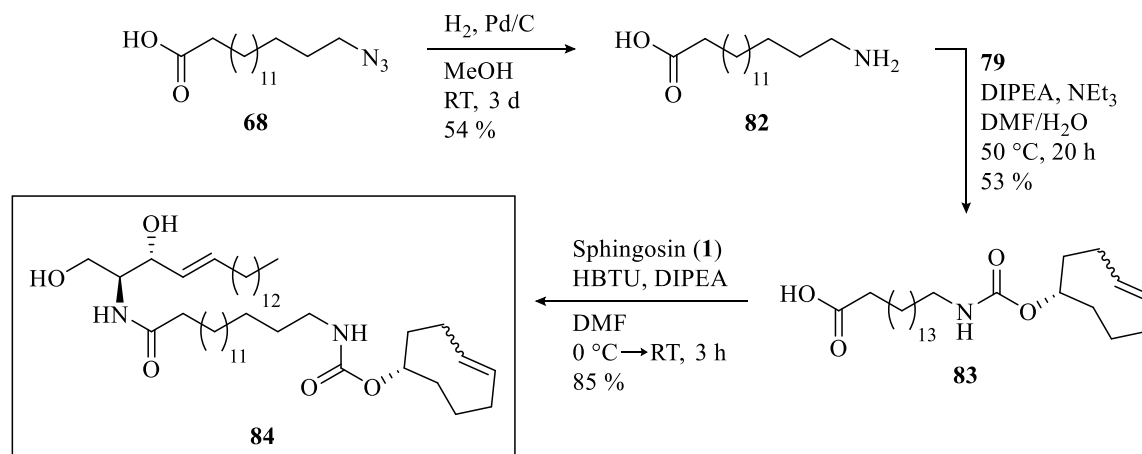
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): $\delta = 0.87$ (t, $^3J_{18,17} = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, *H*-18), 1.25–1.30 (m, 20H, *H*-8–17), 1.33–1.37 (m, 2H, *H*-7), 1.43–1.52 (m, 2H, *H*-4'), 1.53–1.59 (m, 1H, *H*-3'a), 1.59–1.67 (m, 2H, *H*-5'), 1.83–1.88 (m, 1H, *H*-3'b), 2.03–2.07 (m, 2H, *H*-6), 2.21 (br s, 4H, 2 x OH, NH₂), 3.26–3.33 (m, 2H, *H*-6'), 3.39 (dd, $^3J_{2',3'a \text{ od. b}} = 7.9 \text{ Hz}$, $^3J_{2',3' \text{ a od. b}} = 4.7 \text{ Hz}$, 1H, *H*-2'), 3.71 (dd, $^2J_{1a,1b} = 11.4 \text{ Hz}$, $^3J_{1a,2} = 3.5 \text{ Hz}$, 1H, *H*-1a), 3.83–3.86 (m, 1H, *H*-2), 3.91 (dd, $^2J_{1b,1a} = 11.4 \text{ Hz}$, $^3J_{1b,2} = 4.3 \text{ Hz}$, 1H, *H*-1b), 4.30–4.32 (m, 1H, *H*-3), 7.82 (d, $^3J_{\text{NH},2} = 7.7 \text{ Hz}$, 1H, NH), 5.52 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.4 \text{ Hz}$, $^3J_{4,3} = 6.5 \text{ Hz}$, $^4J_{4,6} = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, *H*-4), 5.78 (dtd, $^3J_{5,4} = 15.4 \text{ Hz}$, $^3J_{5,6} = 6.8 \text{ Hz}$, $^4J_{5,3} = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, *H*-5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): $\delta = 14.3$ (*C*-18), 22.8 (*C*-17), 23.1 (*C*-4'), 28.8 (*C*-5'), 29.3 (*C*-7), 29.4, 29.5, 29.6, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 8C, *C*-8–15), 32.1 (*C*-16), 32.5 (*C*-6), 34.8 (*C*-3'), 51.3 (*C*-6'), 55.0 (*C*-2), 55.3 (*C*-2'), 62.7 (*C*-1), 74.3 (*C*-3), 128.8 (*C*-4), 134.5 (*C*-5), 175.7 (*C*-1') ppm.

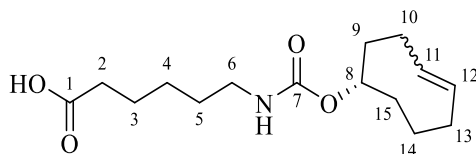
$^{15}\text{N-NMR}$ (CDCl_3 , 60 MHz): $\delta = -352.3$ (NH₂), -309.4 (*C*-N-N-N), -265.8 (NH), -132.8 (*C*-N-N-N) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $C_{24}H_{47}N_5NaO_3^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 476.35711, gef.: 476.35763 ($|\Delta m/z| = 1.08 \text{ ppm}$).

7.2.6 Synthese der cyclooctenfunktionalisierten Ceramide

Cycloocten-C₆-Ceramid:Cycloocten-C₁₆-Ceramid:

**(*S,E/Z*)-6-(((Cyclooct-4-en-1-yloxy)carbonyl)amino)hexansäure /
Cyclooctenyl-C₆-Säure (80)**



Zu einer Suspension aus 100 mg (343 μmol , 1.00 Äq.) des TCO-Aktivesters **79** in trockenem DMF (10 mL) wurden unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss 179 μL (1.03 mmol, 3.00 Äq.) DIPEA und 45.0 mg (343 μmol , 1.00 Äq.) 6-Aminohexansäure (**78**) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d bei RT gerührt und daraufhin mit ges. NH_4Cl -Lösung (75 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (7 x 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl -Lösung (100 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 1:0 \rightarrow 30:1) gereinigt. Es kam teilweise zur *E/Z*-Isomerisierung des Produkts.

Ausbeute: 76.8 mg (271 μmol , 79 %) eines hellgelben, hochviskosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ (283.37 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (DCM/MeOH 30:1, KMnO_4): 0.19.

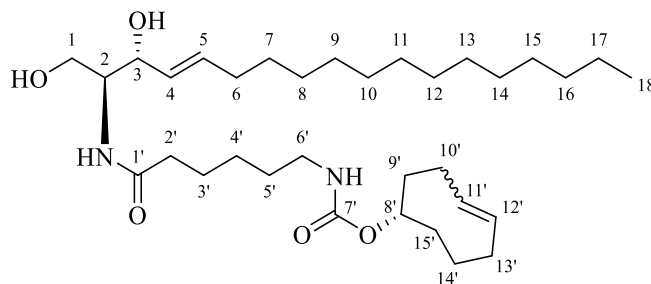
¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (Gemisch aus *E/Z*-Isomeren und Rotameren) = 1.19–1.31 (m, 1H, *H*-15_a), 1.31–1.45 (m, 2H, *H*-4), 1.45–2.28 (m, 12H, *H*-5, *H*-14_a, *H*-3, *H*-9_a, *H*-14_b, *H*-13_a, *H*-10_a, *H*-13_b, *H*-9_b, *H*-15_b), 2.30 (t, $^3J_{2,3} = 7.4$ Hz, 2H, *H*-2), 2.33–2.49 (m, 1H, *H*-10_{bE}, *H*-10_{bZ}), 3.10 (br t, $^3J_{6,5} = 6.6$ Hz, 2H, *H*-6), 4.60–4.73, 4.73–4.84 (jeweils m, zus. 1H, *H*-8_Z, *H*-8_E), 5.43–5.80 (m, 2H, *H*-11_E, *H*-11_Z, *H*-12_E, *H*-12_Z) ppm.

¹³C-NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ (*E*-Isomer, Hauptrotamer) = 25.8 (*C*-3), 27.4 (*C*-4), 29.0 (*C*-14), 30.7 (*C*-5), 30.8 (*C*-10), 33.8 (*C*-15), 34.8 (*C*-2), 35.3 (*C*-13), 41.5 (*C*-6), 42.0 (*C*-9), 71.2 (*C*-8), 132.5 (*C*-11), 136.4 (*C*-12), 158.7 (*C*-7), 177.5 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 306.1676, gef.: 306.1686 ($|\Delta m/z| = 3.4$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[393,397]

(*S,E/Z*)-Cyclooct-4-en-1-yl(6-(((*2S,3R,E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)amino)-6-oxohexyl)carbamat / Cyclooctenyl-C₆-Ceramid (81**)**



Methode A: Zu einer Lösung aus 23.7 mg (83.5 μmol , 1.00 Äq.) der Carbonsäure **80** in trockenem DMF (2 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 43.6 μL (250 μmol , 3.00 Äq.) DIPEA und 38.0 mg (100 μmol , 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 3 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 25.0 mg (83.5 μmol , 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenem DMF (5 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 0 °C und dann 4 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in EtOAc (100 mL) gelöst. Die organische Phase wurde nacheinander mit ges. NH₄Cl-Lösung (20 mL), H₂O (10 mL) und ges. NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 1:0→20:1) gereinigt.

Methode B: Zu einer Lösung aus 21.1 mg (70.6 μmol , 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und 16.2 mg (84.7 μmol , 1.20 Äq.) EDC·HCl in trockenem DCM (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 13.0 mg (84.7 μmol , 1.20 Äq.) HOBt·H₂O und 36.9 μL (212 μmol , 3.00 Äq.) DIPEA gegeben. Das Gemisch wurde bei 0 °C innerhalb von 1 h tropfenweise mit einer Lösung aus 20.0 mg (70.6 μmol , 1.00 Äq.) Carbonsäure (**80**) in trockenem DCM (5 mL) versetzt und daraufhin 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 1:0→20:1) gereinigt.

Ausbeute: *A:* 40.8 mg (72.2 μmol , 87 %), *B:* 29.0 mg (51.3 μmol , 73 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₃₃H₆₀N₂O₅ (564.85 g·mol⁻¹).

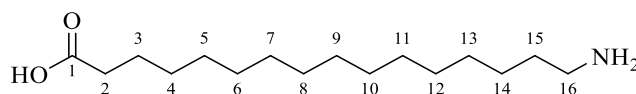
R_f (DCM/MeOH 30:1, KMnO₄): 0.07.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz): δ (Gemisch aus *E/Z*-Isomeren und Rotameren) = 0.90 (t, $^3J_{18,17} = 7.1$ Hz, 3H, *H*-18), 1.15–1.44 (m, 25H, *H*-15'_a, *H*-16, *H*-8–15, *H*-17, *H*-4', *H*-7), 1.44–2.31 (m, 16H, *H*-5', *H*-14'_a, *H*-13'_{aZ}, *H*-3'_a, *H*-13'_{bZ}, *H*-9'_a, *H*-14'_b, *H*-13'_{aE}, *H*-6, *H*-10'_{aE}, *H*-10'_{aZ}, *H*-3'_b, *H*-2', *H*-13'_{bE}, *H*-15'_b, *H*-9'_b), 2.31–2.43 (m, 1H, *H*-10'_{bE}, *H*-10'_{bZ}), 3.07, 3.09 (jeweils t, $^3J_{6,5'} = 7.1/7.0$ Hz, zus. 2H, *H*-6'), 3.83–3.91 (m, 1H, *H*-2), 3.64–3.73 (m, 2H, *H*-1), 4.07 (app br t, $J = 7.1$ Hz, 1H, *H*-3), 4.64–4.71, 4.78–4.83 (jeweils m, zus. 1H, *H*-8'), 5.48 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.3$ Hz, $^3J_{4,3} = 7.3$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.5$ Hz, 1H, *H*-4), 5.51–5.77 (m, 3H, *H*-11'_E, *H*-12'_Z, *H*-11'_Z, *H*-5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz): δ (Gemisch aus *E/Z*-Isomeren und Rotameren) = 14.5 (*C*-18), 23.3 (*C*-10'_Z), 23.7 (*C*-17), 26.0 (*C*-13'_Z), 26.6/26.7/26.7 (*C*-3'), 27.4/27.5 (*C*-4'), 29.0 (*C*-14'), 30.4 (*C*-7), 30.7/30.7 (*C*-5'), 30.3, 30.5, 30.8, 30.8, 30.8 (zus. 8C, *C*-8–15), 30.9 (*C*-10'_E), 33.1 (*C*-16), 33.4 (*C*-6), 33.8 (*C*-15'), 35.2/35.3 (*C*-13'_E), 37.1/37.2 (*C*-2'), 41.5/41.6 (*C*-6'), 42.0 (*C*-9'), 56.8 (*C*-2), 62.2 (*C*-1), 71.2/76.9 (*C*-8'), 73.7 (*C*-3), 130.7 (*C*-12'_Z), 130.8 (*C*-11'_Z), 131.2 (*C*-4), 132.5 (*C*-11'_E), 134.6 (*C*-5), 136.4 (*C*-12'_E), 158.7/158.7 (*C*-7'), 176.1 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{NaO}_5^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 587.43944, gef.: 587.44007 ($|\Delta m/z| = 1.07$ ppm).

16-Aminohexadecansäure (82)



Zu einer im Ultraschallbad (10 min) entgasten Lösung aus 2.00 g (6.72 mmol, 1.00 Äq.) der Azidosäure **68** in MeOH (200 mL) wurden unter Rühren portionsweise 358 mg (10 Gew.-%, 336 μmol , 0.05 Äq.) Pd/C gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d bei RT unter H_2 -Atmosphäre kräftig gerührt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Die Mischung wurde zum Sieden erhitzt, heiß über Celite (3 cm) filtriert und mit siedend heißem MeOH (600 mL) eluiert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 981 mg (3.61 mmol, 54 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{NO}_2$ (271.45 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

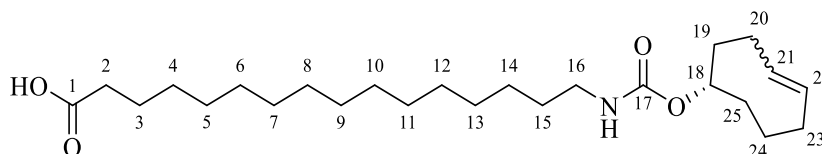
R_f (DCM/MeOH 10:1, Ninhydrin): 0.15.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{NaOD}$, 400 MHz): $\delta = 1.28\text{--}1.34$ (m, 22H, $H\text{-}4\text{--}14$), $1.42\text{--}1.49$ (m, 2H, $H\text{-}15$), $1.55\text{--}1.62$ (m, 2H, $H\text{-}3$), 2.15 (t, $^3J_{2,3} = 7.6$ Hz, 2H, $H\text{-}2$), 2.61 (t, $^3J_{16,15} = 7.2$ Hz, 2H, $H\text{-}16$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{NaOD}$, 100 MHz): $\delta = 27.8$ ($C\text{-}3$), 28.1 , 30.7 , 30.7 , 30.8 , 30.8 , 30.9 (zus. 11C, $C\text{-}4\text{--}14$), 34.0 ($C\text{-}15$), 39.3 ($C\text{-}2$), 42.7 ($C\text{-}16$), 183.3 ($C\text{-}1$) ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{NO}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 272.2584, gef.: 272.2587 ($|\Delta m/z| = 1.0$ ppm).

**(*S,E/Z*)-16-(((Cyclooct-4-en-1-yl)oxy)carbonyl)amino)hexadecansäure /
Cyclooctenyl- C_{16} -Säure (**83**)**



Zu einer Suspension aus 200 mg (687 μmol , 1.00 Äq.) des TCO-Aktivesters **79** in DMF (5 mL), H_2O (0.5 mL), DIPEA (0.5 mL) und NEt_3 (0.5 mL) wurden 186 mg (687 μmol , 1.00 Äq.) 16-Aminohexadecansäure (**82**) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Lichtausschluss 20 h bei 50°C gerührt. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt, der Rückstand daraufhin in DCM (50 mL) gelöst und mit 1 M HCl (50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 40 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 1:0 \rightarrow 50:1) gereinigt. Es kam teilweise zur *E/Z*-Isomerisierung des Produkts.

Ausbeute: 155 mg (365 μmol , 53 %) eines cremefarbenen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{NO}_4$ (423.64 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

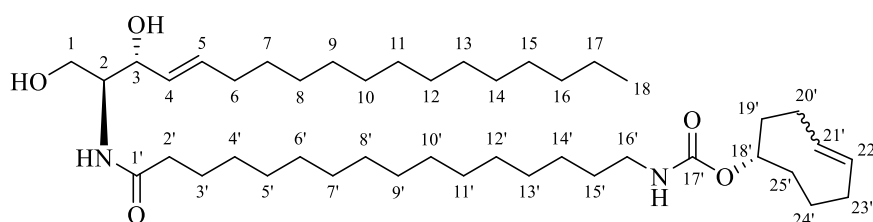
R_f (DCM/MeOH 30:1, KMnO_4): 0.34.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz): δ (Gemisch aus *E/Z*-Isomeren und Rotameren) = $1.23\text{--}1.37$ (m, 23H, $H\text{-}25_a$, $H\text{-}4\text{--}14$), $1.43\text{--}1.54$ (m, 2H, $H\text{-}15$), $1.54\text{--}2.25$ (m, 10H, $H\text{-}24_a$, $H\text{-}3$, $H\text{-}19_a$, $H\text{-}24_b$, $H\text{-}23_a$, $H\text{-}20_a$, $H\text{-}23_b$, $H\text{-}25_b$, $H\text{-}19_b$), 2.27 (t, $^3J_{2,3} = 7.4$ Hz, 2H, $H\text{-}2$), $2.32\text{--}2.40$ (m, 1H, $H\text{-}20_{bE}$, $H\text{-}20_{bZ}$), $2.99\text{--}3.15$ (m, 2H, $H\text{-}16$), $4.62\text{--}4.69$, $4.77\text{--}4.82$ (jeweils m, zus. 1H, $H\text{-}18_Z$, $H\text{-}18_E$), $5.48\text{--}5.71$ (m, 2H, $H\text{-}21_E$, $H\text{-}21_Z$, $H\text{-}22_E$, $H\text{-}22_Z$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz): δ (*E*-Isomer, Hauptrotamer) = 26.1 (*C*-3), 27.9 (*C*-14), 29.0 (*C*-24), 30.3, 30.4, 30.6, 30.7, 30.7, 30.8 (zus. 10C, *C*-4–13), 30.9 (*C*-20), 31.0 (*C*-15), 33.8 (*C*-25), 35.0 (*C*-2), 35.3 (*C*-23), 41.7 (*C*-16), 42.0 (*C*-19), 71.2 (*C*-18), 132.6 (*C*-21), 136.3 (*C*-22), 158.7 (*C*-17), 177.7 (*C*-1) ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{NNaO}_4^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 446.3241, gef.: 446.3236 ($|\Delta m/z| = 1.1$ ppm).

(*S,E/Z*)-Cyclooct-4-en-1-yl(16-(((2*S*,3*R,E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)amino)-16-oxohexadecyl)carbamat / Cyclooctenyl- C_{16} -Ceramid (84**)**



Zu einer Lösung aus 35.4 mg (83.5 μmol , 1.00 Äq.) der Carbonsäure (**83**) in trockenem DMF (3 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 43.6 μL (250 μmol , 3.00 Äq.) DIPEA und 38.0 mg (100 μmol , 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 3 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 25.0 mg (83.5 μmol , 1.00 Äq.) Sphingosin (**1**) und trockenem DMF (5 mL) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 0 °C und dann 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in EtOAc (100 mL) gelöst. Die organische Phase wurde nacheinander mit ges. NH_4Cl -Lösung (20 mL), H_2O (10 mL) und ges. NaCl -Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:0→30:1) gereinigt.

Ausbeute: 50.2 mg (71.2 μmol , 85 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{43}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}_5$ (705.12 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

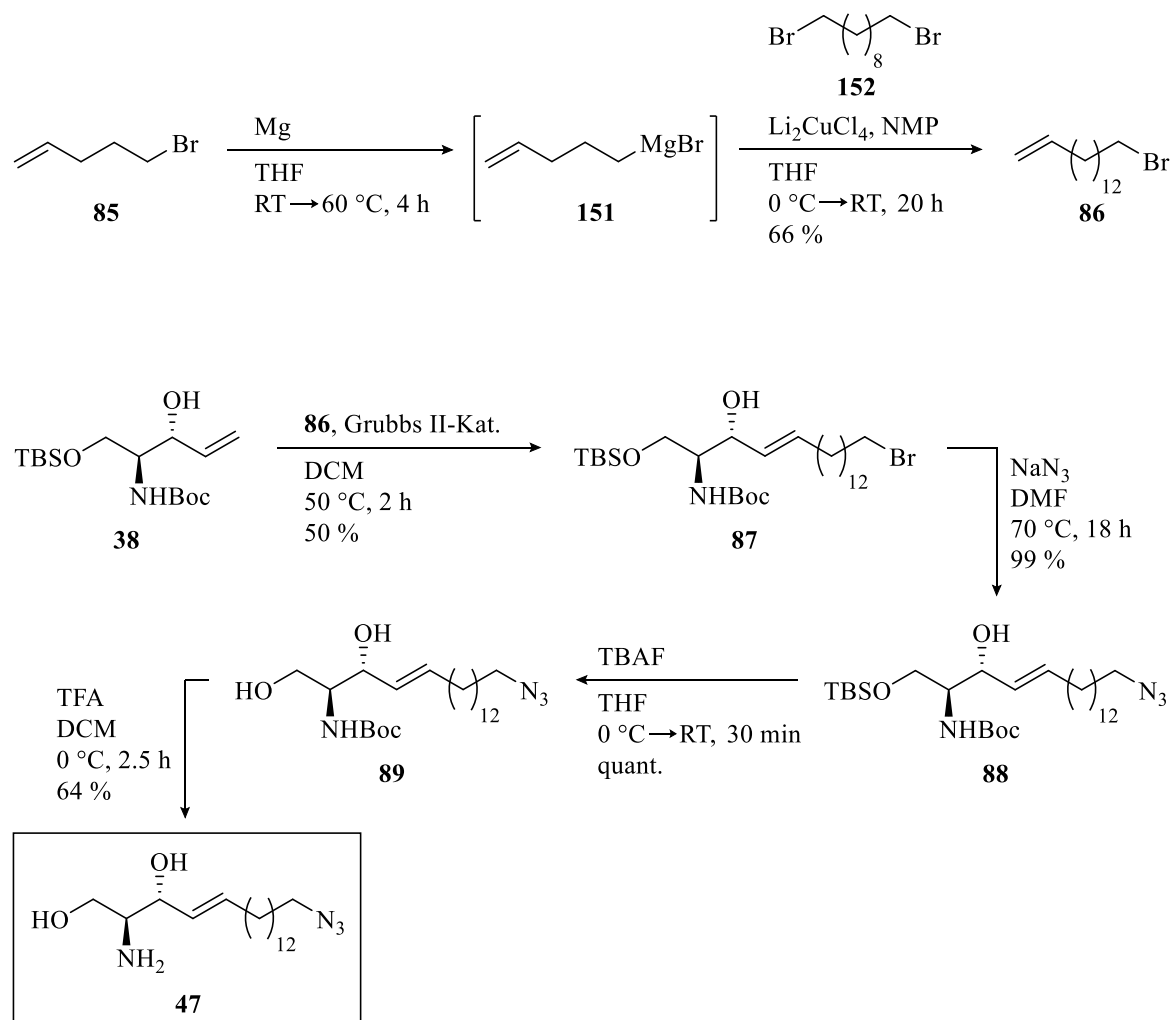
R_f (DCM/MeOH 30:1, KMnO_4): 0.13.

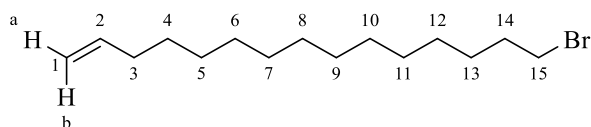
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): δ (Gemisch aus *E/Z*-Isomeren und Rotameren) = 0.87 (t, $^3J_{18,17} = 7.1$ Hz, 3H, *H*-18), 1.11–1.34 (m, 43H, *H*-25'_a, *H*-8–17, *H*-4'–14'), 1.34–1.41 (m, 2H, *H*-7), 1.42–2.36 (m, 17H, *H*-15', *H*-24'_a, *H*-3', *H*-19'_a, *H*-24'_b, *H*-23'_{aE}, *H*-6, *H*-20'_{aE}, *H*-20'_{aZ}, *H*-23'_Z, *H*-2', *H*-23'_{bE}, *H*-25'_b, *H*-19'_b, *H*-20'_{bE}, *H*-20'_{bZ}), 2.83–3.04 (m, 2H, 2 x OH), 3.04–3.27

(m, 2H, *H*-16'), 3.63–3.74 (m, 1H, *H*-1_a), 3.85–3.92 (m, 1H, *H*-2), 3.92–3.99 (m, 1H, *H*-1_b), 4.25–4.35 (m, 1H, *H*-3), 4.63–5.07 (m, 1H, *H*-18'), 5.44–5.74 (m, 3H, *H*-4, *H*-21'_E, *H*-22'_E, *H*-22'_Z, *H*-21'_Z), 5.74–5.82 (m, 1H, *H*-5), 6.29 (br d, $^3J_{\text{NH},2} = 7.1$ Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ (Gemisch aus *E/Z*-Isomeren und Rotameren) = 14.3 (*C*-18), 22.5 (*C*-20'_Z), 22.8 (*C*-17), 25.7 (*C*-23'_Z), 25.9/25.9 (*C*-3'), 26.9 (*C*-14'), 28.1 (*C*-24'), 29.3 (*C*-7), 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 18C, *C*-8–15, *C*-4'–13'), 30.1 (*C*-20'_E), 30.2 (*C*-15'), 32.1 (*C*-16), 32.4 (*C*-6), 32.8 (*C*-25'), 34.5 (*C*-23'_E), 36.9/37.0 (*C*-2'), 41.0/41.1 (*C*-16'), 41.2/41.2 (*C*-19'), 54.5 (app dt, $J = 12.1$ Hz, $J = 5.0$ Hz, *C*-2), 62.5/62.6 (*C*-1), 70.1/70.6/76.0 (*C*-18'), 74.7 (app dt, $J = 19.0$ Hz, $J = 3.0$ Hz, *C*-3), 128.9/129.0 (*C*-4), 129.8 (*C*-21'_Z), 129.9 (*C*-22'_Z), 131.9 (*C*-21'_E), 134.3 (*C*-5), 135.5 (*C*-22'_E), 156.3/156.4 (*C*-17'), 174.0/174.0 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₄₃H₈₀N₂NaO₅⁺ [M+Na]⁺: 727.5959, gef.: 727.5970 ($|\Delta m/z| = 1.4$ ppm); m/z ber. für C₈₆H₁₆₀N₄NaO₁₀⁺ [2M+Na]⁺: 1432.2027, gef.: 1432.2019 ($|\Delta m/z| = 0.5$ ppm).

7.2.7 Synthese von ω -Azidosphingosin

15-Brompentadec-1-en (86)

Zu einer Mischung aus 4.93 g (203 mmol, 2.00 Äq.) Mg-Spänen und trockenem THF (15 mL) wurden zum Aktivieren des Metalls unter Schutzgasatmosphäre zwei Iodkugeln gegeben. Das Gemisch wurde 10 min unter Rückfluss erhitzt und daraufhin bei RT tropfenweise mit einer Lösung aus 12.0 mL (101 mmol, 1.00 Äq.) 5-Brompent-1-en (**85**) in trockenem THF (20 mL) versetzt, sodass die Reaktionsmischung kontinuierlich schwach siedete. Nach vollständiger Zugabe des Bromids **85** wurde das Gemisch 4 h bei 60 °C gerührt. Die entstandene graue Grignard-Lösung (**151**) wurde bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre zu einer Lösung aus 60.8 g (203 mmol, 2.00 Äq.) 1,10-Dibromdecan (**152**), 25.3 mL (0.1 M in THF, 2.53 mmol, 0.025 Äq.) Li₂CuCl₄-Lösung und 39.0 mL (406 mmol, 4.00 Äq.) NMP in trockenem THF (30 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt und daraufhin mit H₂O (200 mL) und ges. NH₄Cl-Lösung (200 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit Et₂O (4 x 200 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der hellgelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy) gereinigt.

Ausbeute: 19.5 g (67.3 mmol, 66 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₁₅H₂₉Br (289.30 g·mol⁻¹).

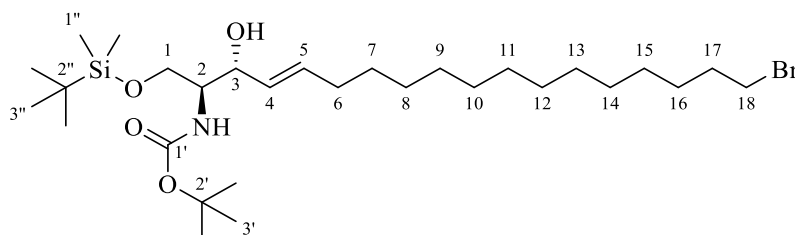
R_f (Cy, KMnO₄): 0.59.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.26–1.32 (m, 16H, *H*-5–12), 1.34–1.45 (m, 4H, *H*-4, *H*-13), 1.81–1.89 (m, 2H, *H*-14), 2.01–2.07 (m, 2H, *H*-3), 3.41 (t, ³*J*_{15,14} = 6.9 Hz, 2H, *H*-15), 4.91–4.94 (m, 1H, *H*-1_a), 4.96–5.02 (m, 1H, *H*-1_b), 5.81 (ddt, ³*J*_{2,1b} = 17.0 Hz, ³*J*_{2,1a} = 10.3 Hz, ³*J*_{2,3} = 6.7 Hz, 1H, *H*-2) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 28.3 (*C*-13), 29.1 (*C*-4), 28.9, 29.3, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 8C, *C*-5–12), 33.0 (*C*-14), 34.0 (*C*-3), 34.2 (*C*-15), 114.2 (*C*-1), 139.4 (*C*-2) ppm.

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[282,283,493]

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-18-Brom-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxyoctadec-4-en-2-yl)carbamat / 1-OTBS-*N*-Boc- ω -Br-Sphingosin (**87**)**



Zu einer Lösung aus 2.00 g (6.03 mmol, 1.00 Äq.) des Allylalkohols **38** und 6.98 g (24.1 mmol, 4.00 Äq.) des Alkens **86** in trockenem DCM (50 mL) wurden unter Schutzgasatmosphäre 154 mg (181 μ mol, 0.03 Äq.) Grubbs II-Kat. gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 50 °C gerührt, das Lösungsmittel daraufhin unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:0→9:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.80 g (3.03 mmol, 50 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₉H₅₈BrNO₄Si (592.78 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 9:1, KMnO₄): 0.25.

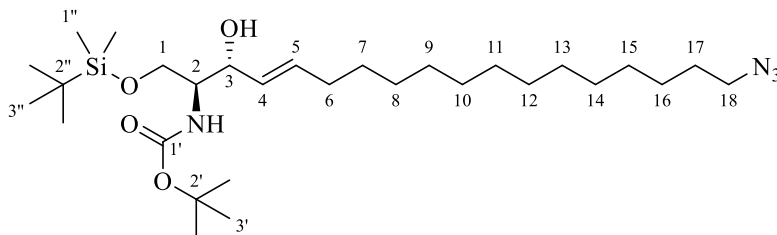
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.06, 0.07 (jeweils s, zus. 6H, *H*-1''), 0.89 (s, 9H, *H*-3''), 1.25–1.33 (m, 16H, *H*-8–15), 1.35–1.41 (m, 4H, *H*-7, *H*-16), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 1.81–1.88 (m, 2H, *H*-17), 2.05 (app br q, J = 7.1 Hz, 1H, *H*-6), 3.33 (br d, $^3J_{OH,3}$ = 8.3 Hz, 1H, OH), 3.40 (t, $^3J_{18,17}$ = 6.9 Hz, 2H, *H*-18), 3.54–3.59 (m, 1H, *H*-2), 3.75 (br dd, $^2J_{1a,1b}$ = 10.3 Hz, $^3J_{1a,2}$ = 2.7 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.93 (dd, $^2J_{1b,1a}$ = 10.3 Hz, $^3J_{1b,2}$ = 3.0 Hz, 1H, *H*-1_b), 4.16–4.21 (m, 1H, *H*-3), 5.24 (br d, $^3J_{NH,2}$ = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.50 (ddt, $^3J_{4,5}$ = 15.4 Hz, $^3J_{4,3}$ = 5.9 Hz, $^4J_{4,6}$ = 1.3 Hz, 1H, *H*-4), 5.75 (dtd, $^3J_{5,4}$ = 15.4 Hz, $^3J_{5,6}$ = 6.8 Hz, $^4J_{5,3}$ = 1.3 Hz, 1H, *H*-5) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = -5.5 (*C*-1''), -5.5 (*C*-1''), 18.3 (*C*-2''), 26.0 (3C, *C*-3''), 28.3 (*C*-16), 28.5 (3C, *C*-3'), 28.9, 29.3, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 9C, *C*-7–15), 32.4 (*C*-6), 33.0 (*C*-17), 34.2 (*C*-18), 54.6 (*C*-2), 63.6 (*C*-1), 74.8 (*C*-3), 79.6 (*C*-2'), 129.6 (*C*-4), 133.2 (*C*-5), 155.9 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₉H₅₈BrNNaO₄Si⁺ [M+Na]⁺: 614.32107, gef.: 614.32195 (| $\Delta m/z$ | = 1.44 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[282,283,406]

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-18-azido-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxyoctadec-4-en-2-yl)carbamat / 1-OTBS-*N*-Boc- ω -N₃-Sphingosin (**88**)**



Zu einer Lösung aus 1.00 g (1.69 mmol, 1.00 Äq.) des Bromids **87** in DMF (20 mL) wurden 329 mg (5.06 mmol, 3.00 Äq.) NaN₃ gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei 70 °C gerührt, daraufhin bei RT mit H₂O (100 mL) versetzt und mit EtOAc (5 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und die Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 930 mg (1.68 mmol, 99 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₉H₅₈N₄O₄Si (554.89 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 9:1, KMnO₄): 0.25.

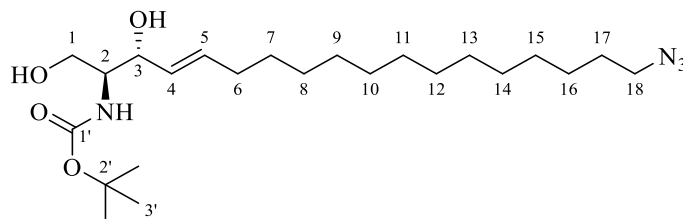
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.07, 0.07 (jeweils s, zus. 6H, *H*-1''), 0.90 (s, 9H, *H*-3''), 1.25–1.39 (m, 20H, *H*-7–16), 1.45 (s, 9H, *H*-3'), 1.56–1.63 (m, 2H, *H*-17), 2.02–2.08 (m, 2H, *H*-6), 3.25 (t, ³*J*_{18,17} = 7.0 Hz, 2H, *H*-18), 3.34 (br d, ³*J*_{OH,3} = 8.2 Hz, 1H, OH), 3.55–3.58 (m, 1H, *H*-2), 3.75 (br dd, ²*J*_{1a,1b} = 10.3 Hz, ³*J*_{1a,2} = 2.6 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.94 (dd, ²*J*_{1b,1a} = 10.3 Hz, ³*J*_{1b,2} = 3.0 Hz, 1H, *H*-1_b), 4.17–4.21 (m, 1H, *H*-3), 5.24 (br d, ³*J*_{NH,2} = 8.1 Hz, 1H, NH), 5.50 (ddt, ³*J*_{4,5} = 15.4 Hz, ³*J*_{4,3} = 5.8 Hz, ⁴*J*_{4,6} = 1.3 Hz, 1H, *H*-4), 5.75 (dtd, ³*J*_{5,4} = 15.4 Hz, ³*J*_{5,6} = 6.8 Hz, ⁴*J*_{5,3} = 1.3 Hz, 1H, *H*-5) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = -5.5 (*C*-1''), -5.5 (*C*-1''), 18.3 (*C*-2''), 25.9 (3C, *C*-3''), 26.8 (*C*-16), 28.5 (3C, *C*-3'), 29.0 (*C*-17), 29.3, 29.3, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 9C, *C*-7–15), 32.4 (*C*-6), 51.6 (*C*-18), 54.6 (*C*-2), 63.6 (*C*-1), 74.8 (*C*-3), 79.6 (*C*-2'), 129.6 (*C*-4), 133.2 (*C*-5), 155.9 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₉H₅₈N₄NaO₄Si⁺ [M+Na]⁺: 577.41195, gef.: 577.41152 (| $\Delta m/z$ | = 0.75 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[282,283,406]

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-18-azido-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)carbamat /
N-Boc- ω -N₃-Sphingosin (**89**)**



Zu einer Lösung aus 1.84 g (3.32 mmol, 1.00 Äq.) des Silylethers **88** in trockenem THF (10 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 3.98 mL (1 M in THF, 3.98 mmol, 1.20 Äq.) TBAF-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und daraufhin mit H₂O (50 mL) und ges. NaCl-Lösung (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.46 g (3.31 mmol, quant.) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₃H₄₄N₄O₄ (440.63 g·mol⁻¹).

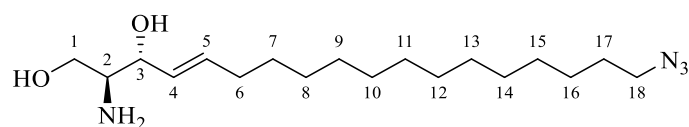
R_f (Cy/EtOAc 2:1, KMnO₄): 0.20.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.25–1.38 (m, 20H, *H*-7–16), 1.45 (s, 9H, *H*-3'), 1.56–1.63 (m, 2H, *H*-17), 2.02–2.07 (m, 2H, *H*-6), 2.61 (br s, 2H, 2 x OH), 3.25 (t, ³*J*_{18,17} = 7.0 Hz, 2H, *H*-18), 3.58–3.61 (m, 1H, *H*-2), 3.70 (dd, ²*J*_{1a,1b} = 11.3 Hz, ³*J*_{1a,2} = 3.6 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.93 (dd, ²*J*_{1b,1a} = 11.3 Hz, ³*J*_{1b,2} = 3.7 Hz, 1H, *H*-1_b), 4.30–4.33 (m, 1H, *H*-3), 5.31 (br d, ³*J*_{NH,2} = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.52 (ddt, ³*J*_{4,5} = 15.4 Hz, ³*J*_{4,3} = 6.5 Hz, ⁴*J*_{4,6} = 1.4 Hz, 1H, *H*-4), 5.77 (dtd, ³*J*_{5,4} = 15.4 Hz, ³*J*_{5,6} = 6.8 Hz, ⁴*J*_{5,3} = 1.2 Hz, 1H, *H*-5) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 26.8 (*C*-16), 28.5 (3*C*, *C*-3'), 28.9 (*C*-17), 29.2, 29.3, 29.3, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 9*C*, *C*-7–15), 32.4 (*C*-6), 51.6 (*C*-18), 55.5 (*C*-2), 62.7 (*C*-1), 74.9 (*C*-3), 79.9 (*C*-2'), 129.0 (*C*-4), 134.2 (*C*-5), 156.4 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₃H₄₄N₄NaO₄⁺ [M+Na]⁺: 463.32548, gef.: 463.32575 (| $\Delta m/z$ | = 0.59 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[282,283,406]

(2*S*,3*R*,*E*)-2-Amino-18-azido-octadec-4-en-1,3-diol / ω -Azidosphingosin (47)

Zu einer Lösung aus 100 mg (227 μmol) des Carbamats **89** in DCM (2.5 mL) wurden bei 0 °C 500 μL TFA gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h bei 0 °C gerührt und daraufhin mit H_2O (10 mL) und 1 M NaOH (10 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (6 x 10 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH/25 % NH_3 19:1:0.02 \rightarrow 15:1:0.02) gereinigt. Das Rohprodukt wurde in DCM (20 mL) gelöst und mit einer Mischung aus H_2O (20 mL) und ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Nach der Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (5 x 5 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 49.3 mg (145 μmol , 64 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_2$ (340.51 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (DCM/MeOH/ NET_3 10:1:0.01, KMnO_4): 0.08.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ = 1.31–1.44 (m, 20H, *H*-7–16), 1.55–1.61 (m, 2H, *H*-17), 2.06–2.11 (m, 2H, *H*-6), 2.74–2.79 (m, 1H, *H*-2), 3.28 (t, $^3J_{18,17}$ = 6.9 Hz, 2H, *H*-18), 3.50 (dd, $^2J_{1a,1b}$ = 10.9 Hz, $^3J_{1a,2}$ = 7.0 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.68 (dd, $^2J_{1b,1a}$ = 10.9 Hz, $^3J_{1b,2}$ = 4.4 Hz, 1H, *H*-1_b), 3.98 (app br t, J = 6.7 Hz, 1H, *H*-3), 5.49 (ddt, $^3J_{4,5}$ = 15.3 Hz, $^3J_{4,3}$ = 7.4 Hz, $^4J_{4,6}$ = 1.4 Hz, 1H, *H*-4), 5.74 (dtd, $^3J_{5,4}$ = 15.3 Hz, $^3J_{5,6}$ = 6.8 Hz, $^4J_{5,3}$ = 0.8 Hz, 1H, *H*-5) ppm.

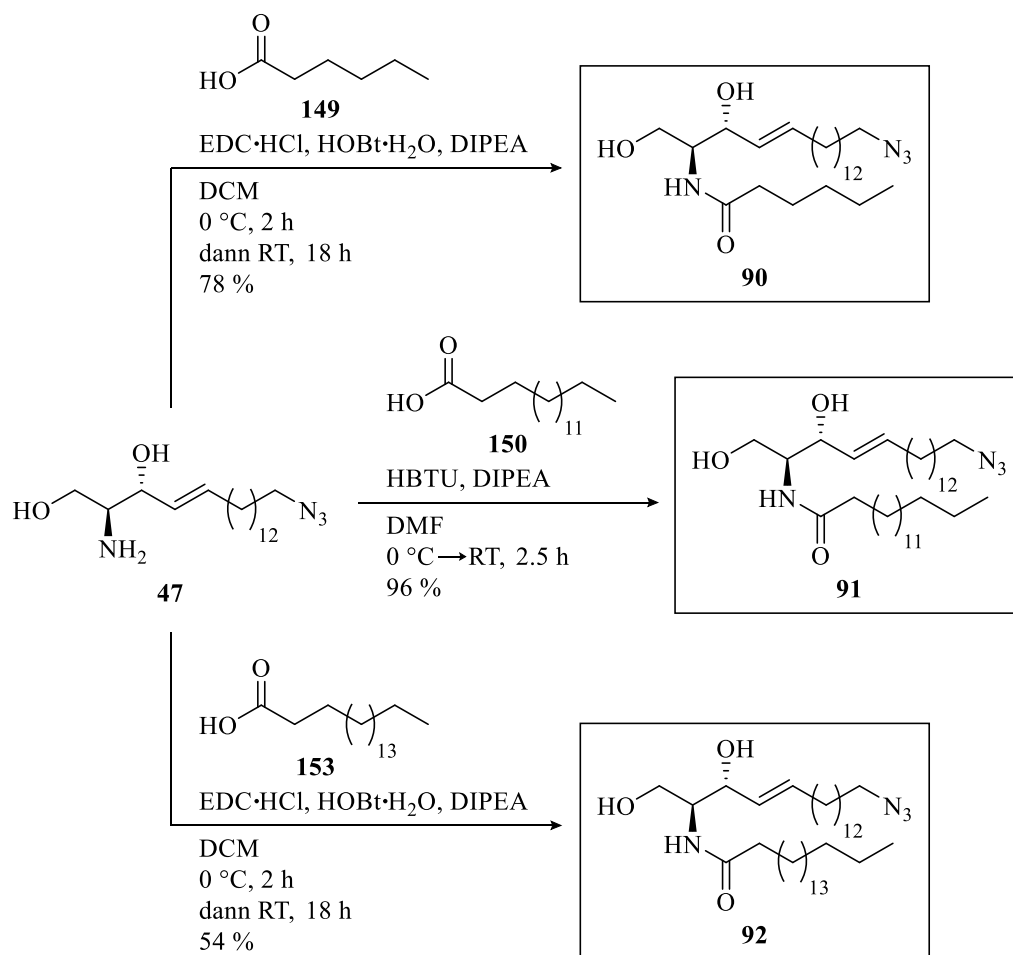
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz): δ = 27.8 (*C*-16), 29.9 (*C*-17), 30.3, 30.4, 30.4, 30.7, 30.7, 30.8, 30.8 (zus. 9C, *C*-7–15), 33.4 (*C*-6), 52.4 (*C*-18), 58.0 (*C*-2), 64.1 (*C*-1), 75.0 (*C*-3), 130.7 (*C*-4), 135.2 (*C*-5) ppm.

$^{15}\text{N-NMR}$ (CD_3OD , 40 MHz): δ = -360.6 (NH_2), -310.6 (*C-N-N-N*), -172.0 (*C-N-N-N*), -132.7 (*C-N-N-N*) ppm.

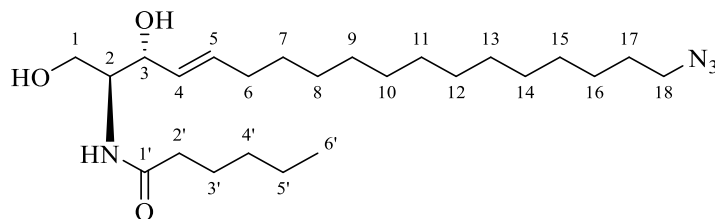
HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_2^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 341.29110, gef.: 341.29179 ($|\Delta m/z|$ = 2.01 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[282,406]

7.2.8 Synthese von Ceramiden mit azidfunktionalisiertem Grundgerüst



N-((2*S*,3*R*,*E*)-18-Azido-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)hexanamid /
 ω -N₃-C₆-Ceramid (90)



Zu einer Lösung aus 50.0 mg (147 μ mol, 1.00 Äq.) ω -Azidosphingosin (**47**) und 33.8 mg (167 μ mol, 1.20 Äq.) EDC·HCl in trockenem DCM (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 27.0 mg (167 μ mol, 1.20 Äq.) HOBt·H₂O und 46.0 μ L (264 μ mol, 1.80 Äq.) DIPEA gegeben. Das Gemisch wurde bei 0 °C innerhalb von 2 h tropfenweise mit einer Lösung aus 17.1 mg (147 μ mol, 1.00 Äq.) Hexansäure (**149**) in trockenem DCM (10 mL) versetzt und daraufhin 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 50.1 mg (114 μ mol, 78 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₄H₄₆N₄O₃ (438.66 g·mol⁻¹).

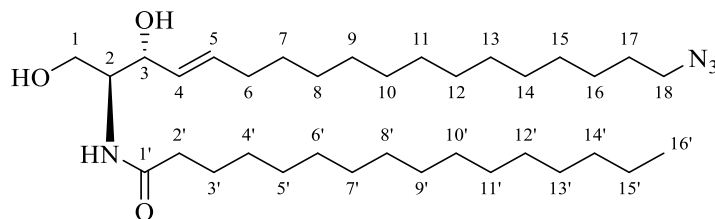
R_f (EtOAc, KMnO₄): 0.22.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.88 (t, ³J_{6,5'} = 7.0 Hz, 3H, H-6'), 1.24–1.36 (m, 24H, H-7–16, H-4', H-5'), 1.54–1.65 (m, 4H, H-3', H-17), 2.00–2.06 (m, 2H, H-6), 2.20 (t, ³J_{2',3'} = 7.6 Hz, 2H, H-2'), 3.24 (t, ³J_{18,17} = 7.0 Hz, 2H, H-18), 3.38, 3.41 (jeweils br s, zus. 2H, 2 x OH), 3.65–3.67 (m, 1H, H-1_a), 3.85–3.92 (m, 2H, H-2, H-1_b), 4.26 (app br s, 1H, H-3), 5.49 (ddt, ³J_{4,5} = 15.4 Hz, ³J_{4,3} = 6.4 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.3 Hz, 1H, H-4), 5.75 (dtd, ³J_{5,4} = 15.4 Hz, ³J_{5,6} = 6.7 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.1 Hz, 1H, H-5), 6.37 (d, ³J_{NH,2} = 7.5 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.1 (C-6'), 22.5 (C-5'), 25.5 (C-3'), 26.8 (C-16), 28.9 (C-17), 29.3, 29.4, 29.6, 29.6, 29.6, 29.7, 29.8 (zus. 9C, C-7–15), 31.5 (C-4'), 32.4 (C-6), 36.9 (C-2'), 51.6 (C-18), 54.7 (C-2), 62.4 (C-1), 74.4 (C-3), 128.9 (C-4), 134.2 (C-5), 174.2 (C-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₂₄H₄₆N₄NaO₃⁺ [M+Na]⁺: 461.3462, gef.: 461.3465 (| Δ m/z| = 0.6 ppm).

***N*-((2*S*,3*R*,*E*)-18-Azido-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)palmitamid /
 ω -N₃-C₁₆-Ceramid (91)**



Zu einer Lösung aus 75.3 mg (294 μ mol, 1.00 Äq.) Hexadecansäure (**150**) und 153 μ L (881 μ mol, 3.00 Äq.) DIPEA in trockenem DMF (5 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 134 mg (352 μ mol, 1.20 Äq.) HBTU gegeben. Das Gemisch wurde 3 min bei 0 °C und dann 10 min bei RT gerührt. Nach der Zugabe von 100 mg (294 μ mol, 1.00 Äq.) ω -Azidosphingosin (**47**) und trockenem DMF (2 mL) wurde die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 162 mg (281 μ mol, 96 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₃₄H₆₆N₄O₃ (578.93 g·mol⁻¹).

R_f (EtOAc, KMnO₄): 0.27.

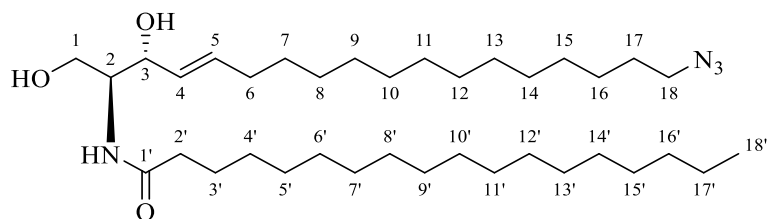
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.87 (t, ³J_{16',15'} = 6.9 Hz, 3H, H-16'), 1.24–1.37 (m, 44H, H-7–16, H-4'–15'), 1.55–1.65 (m, 4H, H-3', H-17), 2.04 (app br q, J = 7.0 Hz, 2H, H-6), 2.21 (t, ³J_{2',3'} = 7.6 Hz, 2H, H-2'), 3.16 (br s, 2H, 2 x OH), 3.25 (t, ³J_{18,17} = 7.0 Hz, 2H, H-18), 3.68 (br dd, ²J_{1a,1b} = 10.9 Hz, ³J_{1a,2} = 3.0 Hz, 1H, H-1_a), 3.86–3.94 (m, 2H, H-2, H-1_b), 4.28–4.30 (m, 1H, H-3), 5.51 (ddt, ³J_{4,5} = 15.4 Hz, ³J_{4,3} = 6.4 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.3 Hz, 1H, H-4), 5.77 (dtd, ³J_{5,4} = 15.4 Hz, ³J_{5,6} = 6.8 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.1 Hz, 1H, H-5), 6.32 (d, ³J_{NH,2} = 7.4 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.3 (C-16'), 22.8 (C-15'), 25.9 (C-3'), 26.8 (C-16), 29.0 (C-17), 29.3, 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 19C, C-7–15, C-4'–13'), 32.1 (C-14'), 32.4 (C-6), 37.0 (C-2'), 51.6 (C-18), 54.7 (C-2), 62.5 (C-1), 74.6 (C-3), 128.9 (C-4), 134.3 (C-5), 174.2 (C-1') ppm.

¹⁵N-NMR (CDCl₃, 40 MHz): δ = -309.2 (C-N-N-N), -263.3 (NH), -132.7 (C-N-N-N) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₃₄H₆₆N₄NaO₃⁺ [M+Na]⁺: 601.50271, gef.: 601.50291 (| Δ m/z| = 0.32 ppm).

N-((2*S*,3*R*,*E*)-18-Azido-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)stearamid /
 ω -N₃-C₁₈-Ceramid (92)



Zu einer Lösung aus 50.0 mg (147 μ mol, 1.00 Äq.) ω -Azidosphingosin (**47**) und 33.8 mg (167 μ mol, 1.20 Äq.) EDC·HCl in trockenem DCM (10 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 27.0 mg (167 μ mol, 1.20 Äq.) HOBt·H₂O und 46.0 μ L (264 μ mol, 1.80 Äq.) DIPEA gegeben. Das Gemisch wurde bei 0 °C innerhalb von 2 h tropfenweise mit einer Lösung aus 41.8 mg (147 μ mol, 1.00 Äq.) Stearinsäure (**153**) in trockenem DCM (10 mL) versetzt und daraufhin 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 48.5 mg (79.9 μ mol, 54 %) eines farblosen Feststoffs.

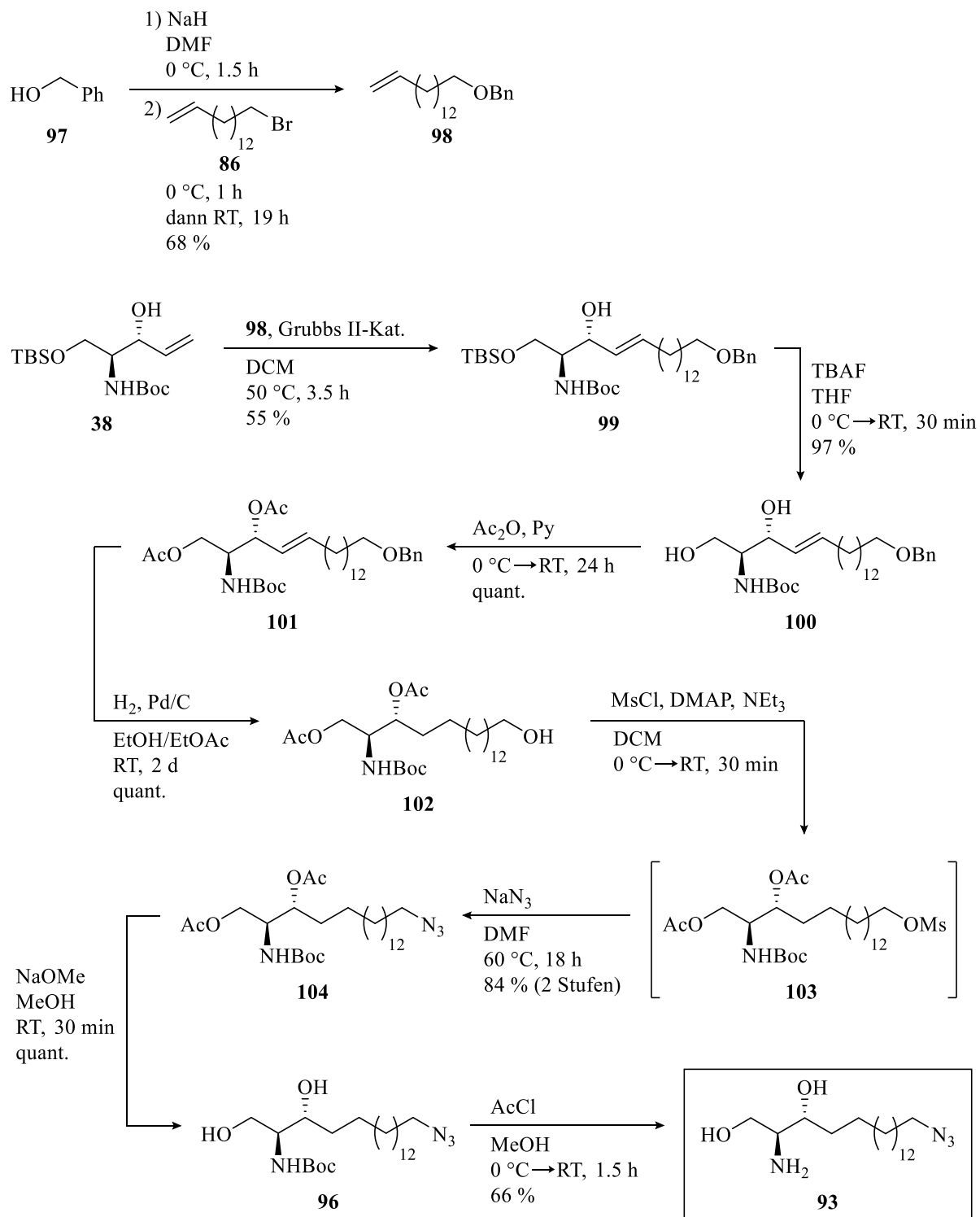
Summenformel: C₃₆H₇₀N₄O₃ (606.98 g·mol⁻¹).

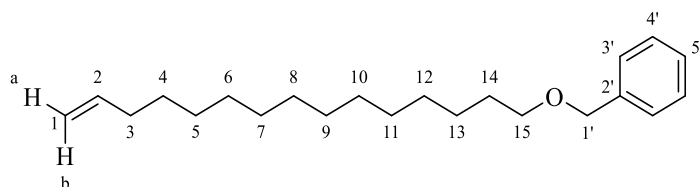
R_f (EtOAc, KMnO₄): 0.27.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.87 (t, ³J_{18',17'} = 6.9 Hz, 3H, H-18'), 1.24–1.37 (m, 48H, H-7–16, H-4'–17'), 1.55–1.66 (m, 4H, H-3', H-17), 2.04 (app br q, J = 7.1 Hz, 2H, H-6), 2.21 (t, ³J_{2',3'} = 7.6 Hz, 2H, H-2'), 3.04 (br s, 2H, 2 x OH), 3.25 (t, ³J_{18',17'} = 7.0 Hz, 2H, H-18), 3.67–3.70 (m, 1H, H-1_a), 3.87–3.95 (m, 2H, H-2, H-1_b), 4.28–4.32 (m, 1H, H-3), 5.51 (ddt, ³J_{4,5} = 15.4 Hz, ³J_{4,3} = 6.4 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.3 Hz, 1H, H-4), 5.77 (dtd, ³J_{5,4} = 15.4 Hz, ³J_{5,6} = 6.8 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.1 Hz, 1H, H-5), 6.30 (d, ³J_{NH,2} = 7.4 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.3 (C-18'), 22.8 (C-17'), 25.9 (C-3'), 26.8 (C-16), 29.0 (C-17), 29.3, 29.3, 29.4, 29.4, 29.5, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 21C, C-7–15, C-4'–15'), 32.1 (C-16'), 32.4 (C-6), 37.0 (C-2'), 51.6 (C-18), 54.6 (C-2), 62.6 (C-1), 74.7 (C-3), 128.9 (C-4), 134.3 (C-5), 174.1 (C-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₃₆H₇₀N₄NaO₃⁺ [M+Na]⁺: 629.5340, gef.: 629.5344 (| Δ m/z| = 0.6 ppm).

7.2.9 Synthese von ω -Azidosphinganin

((Pentadec-14-en-1-yloxy)methyl)benzol / ω -OBn-Pentadecen (98)

Zu einer Lösung aus 1.78 mL (17.1 mmol, 2.00 Äq.) Benzylalkohol (**97**) in trockenem DMF (20 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 411 mg (60 %ige Suspension in Paraffinöl, 17.1 mmol, 2.00 Äq.) Natriumhydrid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h bei 0 °C gerührt und daraufhin mit 2.48 g (8.57 mmol, 1.00 Äq.) des Bromids **86** versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei 0 °C und dann 19 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von ges. NH₄Cl-Lösung (50 mL) und Extraktion mit EtOAc (4 x 100 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:0→9:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.83 g (5.79 mmol, 68 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₂₂H₃₆O (316.53 g·mol⁻¹).

R_f (Cy, KMnO₄): 0.07.

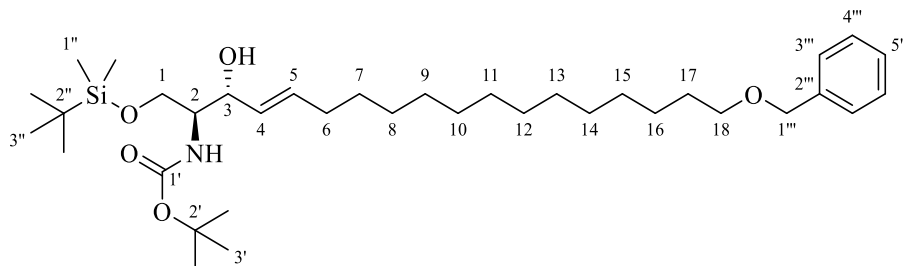
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.26–1.30 (m, 16H, *H*-5–12), 1.33–1.40 (m, 4H, *H*-4, *H*-13), 1.58–1.65 (m, 2H, *H*-14), 2.02–2.08 (m, 2H, *H*-3), 3.47 (t, ³*J*_{15,14} = 6.7 Hz, 2H, *H*-15), 4.51 (s, 2H, *H*-1'), 4.92–4.96 (m, 1H, *H*-1_a), 4.97–5.03 (m, 1H, *H*-1_b), 5.82 (ddt, ³*J*_{2,1b} = 17.0 Hz, ³*J*_{2,1a} = 10.3 Hz, ³*J*_{2,3} = 6.7 Hz, 1H, *H*-2), 7.26–7.35 (m, 5H, *H*-3'–5') ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 26.3 (*C*-13), 29.1 (*C*-4), 29.3, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8 (zus. 8C, *C*-5–12), 29.9 (*C*-14), 34.0 (*C*-3), 70.7 (*C*-15), 73.0 (*C*-1'), 114.2 (*C*-1), 127.6 (*C*-5'), 127.8 (2C, *C*-3'), 128.5 (2C, *C*-4'), 138.9 (*C*-2'), 139.4 (*C*-2) ppm.

HRMS (APCI⁺): *m/z* ber. für C₂₂H₃₆O⁺ [*M*·]⁺: 316.2761, gef.: 316.2751 ($|\Delta m/z|$ = 3.16 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[494]

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-18-(benzyloxy)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxyoctadec-4-en-2-yl)carbamat / 1-OTBS-*N*-Boc- ω -OBn-Sphingosin (**99**)**



Zu einer Lösung aus 440 mg (1.33 mmol, 1.00 Äq.) des Allylkohols **38** und 1.68 g (5.31 mmol, 4.00 Äq.) des Alkens **98** in trockenem DCM (13 mL) wurden unter Schutzgasatmosphäre 33.6 mg (39.8 μ mol, 0.03 Äq.) Grubbs II-Kat. gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3.5 h bei 50 °C gerührt, das Lösungsmittel daraufhin unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:0→8:1) gereinigt.

Ausbeute: 455 mg (734 μ mol, 55 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₃₆H₆₅NO₅Si (620.00 g·mol⁻¹).

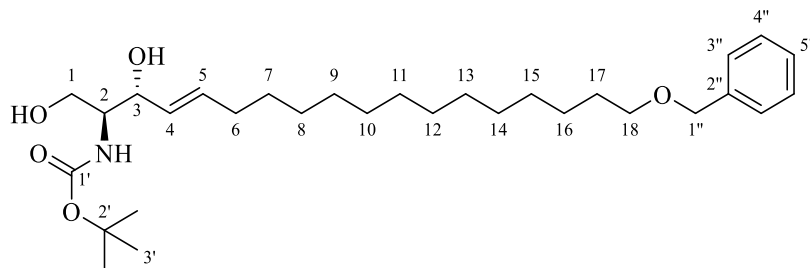
R_f (Cy/EtOAc 7:1, KMnO₄): 0.32.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.07 (s, 3H, H-1''), 0.07 (s, 3H, H-1''), 0.90 (s, 9H, H-3''), 1.25–1.32 (m, 16H, H-8–15), 1.33–1.39 (m, 4H, H-7, H-16), 1.45 (s, 9H, H-3'), 1.57–1.64 (m, 2H, H-17), 2.02–2.08 (m, 2H, H-6), 3.34 (br d, ³J_{OH,3} = 8.2 Hz, 1H, OH), 3.46 (t, ³J_{18,17} = 6.7 Hz, 2H, H-18), 3.56–3.58 (m, 1H, H-2), 3.75 (br dd, ²J_{1a,1b} = 10.3 Hz, ³J_{1a,2} = 2.7 Hz, 1H, H-1_a), 3.94 (dd, ²J_{1b,1a} = 10.3 Hz, ³J_{1b,2} = 3.0 Hz, 1H, H-1_b), 4.17–4.21 (m, 1H, H-3), 4.50 (s, 2H, H-1'''), 5.24 (br d, ³J_{NH,2} = 8.2 Hz, 1H, NH), 5.50 (ddt, ³J_{4,5} = 15.2 Hz, ³J_{4,3} = 5.9 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.3 Hz, 1H, H-4), 5.75 (dtd, ³J_{5,4} = 15.2 Hz, ³J_{5,6} = 6.8 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.3 Hz, 1H, H-5), 7.25–7.34 (m, 5H, H-3'''–5''') ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = -5.5 (C-1''), -5.5 (C-1''), 18.3 (C-2''), 26.0 (3C, C-3''), 26.3 (C-16), 28.5 (3C, C-3'), 29.3 (C-7), 29.4, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 29.8 (zus. 8C, C-8–15), 29.9 (C-17), 32.4 (C-6), 54.6 (C-2), 63.6 (C-1), 70.7 (C-18), 73.0 (C-1'''), 74.8 (C-3), 79.6 (C-2'), 127.6 (C-5'''), 127.7 (2C, C-3'''), 128.5 (2C, C-4'''), 129.6 (C-4), 133.2 (C-5), 138.8 (C-2'''), 155.9 (C-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₃₆H₆₅NNaO₅Si⁺ [M+Na]⁺: 642.45242, gef.: 642.45372 (| Δ m/z| = 2.02 ppm).

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-18-(benzyloxy)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl)carbamat /
N-Boc- ω -OBn-Sphingosin (100)**



Zu einer Lösung aus 400 mg (645 μmol , 1.00 Äq.) des Silylethers **99** in trockenem THF (20 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 774 μL (1 M in THF, 774 μmol , 1.20 Äq.) TBAF-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei RT gerührt und daraufhin mit H₂O (25 mL) und ges. NH₄Cl-Lösung (25 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (4 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 318 mg (628 μmol , 97 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₃₀H₅₁NO₅ (505.74 g·mol⁻¹).

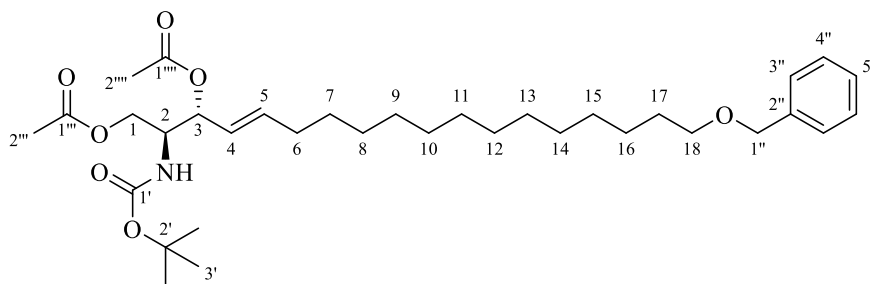
R_f (Cy/EtOAc 2:1, KMnO₄): 0.13.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.25–1.31 (m, 16H, *H*-8–15), 1.33–1.38 (m, 4H, *H*-7, *H*-16), 1.45 (s, 9H, *H*-3'), 1.57–1.64 (m, 2H, *H*-17), 2.02–2.07 (m, 2H, *H*-6), 2.54 (br s, 2H, 2 x OH), 3.46 (t, ³*J*_{18,17} = 6.9 Hz, 2H, *H*-18), 3.55–3.63 (m, 1H, *H*-2), 3.69 (dd, ²*J*_{1a,1b} = 11.3 Hz, ³*J*_{1a,2} = 3.6 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.92 (dd, ²*J*_{1b,1a} = 11.3 Hz, ³*J*_{1b,2} = 3.7 Hz, 1H, *H*-1_b), 4.29–4.32 (m, 2H, *H*-3), 4.50 (s, 2H, *H*-1''), 5.31 (br d, ³*J*_{NH,2} = 6.1 Hz, 1H, NH), 5.52 (ddt, ³*J*_{4,5} = 15.3 Hz, ³*J*_{4,3} = 6.5 Hz, ⁴*J*_{4,6} = 1.4 Hz, 1H, *H*-4), 5.77 (dtd, ³*J*_{5,4} = 15.3 Hz, ³*J*_{5,6} = 6.8 Hz, ⁴*J*_{5,3} = 1.4 Hz, 1H, *H*-5), 7.25–7.34 (m, 5H, *H*-3''–5'') ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 26.3 (*C*-16), 28.5 (3C, *C*-3'), 29.2 (*C*-7), 29.3, 29.6, 29.6, 29.7, 29.8 (zus. 8C, *C*-8–15), 29.9 (*C*-17), 32.4 (*C*-6), 55.5 (*C*-2), 62.8 (*C*-1), 70.7 (*C*-18), 73.0 (*C*-1''), 75.0 (*C*-3), 79.9 (*C*-2'), 127.6 (*C*-5''), 127.8 (2C, *C*-3''), 128.5 (2C, *C*-4''), 129.1 (*C*-4), 134.3 (*C*-5), 138.8 (*C*-2''), 156.3 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₃₀H₅₁NNaO₅⁺ [M+Na]⁺: 528.36594, gef.: 528.36712 (| $\Delta m/z$ | = 2.23 ppm).

**(2*S*,3*R*,*E*)-18-(Benzyloxy)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)octadec-4-en-1,3-diylldiacetat /
1,3-Di-OAc-*N*-Boc- ω -OBn-Sphingosin (101)**



Zu einer Lösung aus 285 mg (564 μmol , 1.00 Äq.) des Diols **100** in trockenem Pyridin (10 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 798 μL (8.45 mmol, 15.0 Äq.) Ac_2O gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und alle flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 331 mg (561 μmol , quant.) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{NO}_7$ (589.81 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

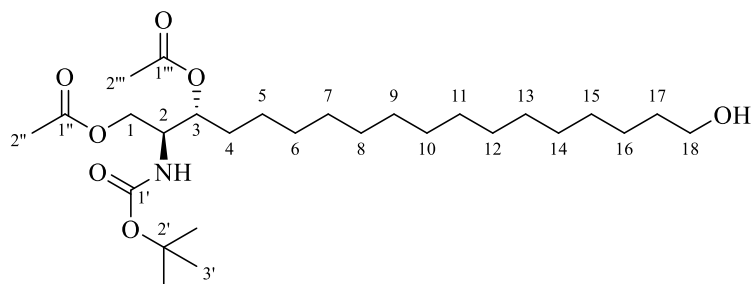
R_f (Cy/EtOAc 3:1, KMnO_4): 0.36.

¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 1.24–1.29 (m, 16H, *H*-8–15), 1.31–1.37 (m, 4H, *H*-7, *H*-16), 1.43 (s, 9H, *H*-3'), 1.57–1.64 (m, 2H, *H*-17), 1.99–2.04 (m, 2H, *H*-6), 2.05 (s, 3H, *H*-2'''), 2.06 (s, 3H, *H*-2''), 3.46 (t, $^3J_{18,17} = 6.7$ Hz, 2H, *H*-18), 4.02–4.12 (m, 2H, *H*-1_a, *H*-2), 4.23 (br dd, $^2J_{1b,1a} = 10.8$ Hz, $^3J_{1b,2} = 5.3$ Hz, 1H, *H*-1_b), 4.50 (s, 2H, *H*-1''), 4.70 (br d, $^3J_{\text{NH},2} = 9.2$ Hz, 1H, NH), 5.24–5.27 (m, 1H, *H*-3), 5.35–5.41 (m, 1H, *H*-4), 5.75–5.82 (m, 1H, *H*-5), 7.24–7.34 (m, 5H, *H*-3''–5'') ppm.

¹³C-NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 20.9 (*C*-2'''), 21.3 (*C*-2'''), 26.3 (*C*-16), 28.4 (3C, *C*-3'), 28.9 (*C*-7), 29.3, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 8C, *C*-8–15), 29.9 (*C*-17), 32.4 (*C*-6), 51.9 (*C*-2), 63.0 (*C*-1), 70.6 (*C*-18), 73.0 (*C*-1''), 74.1 (*C*-3), 79.9 (*C*-2'), 124.1 (*C*-4), 127.6 (*C*-5''), 127.7 (2C, *C*-3''), 128.4 (2C, *C*-4''), 137.5 (*C*-5), 138.8 (*C*-2''), 155.4 (*C*-1'), 170.0 (*C*-1'''), 170.9 (*C*-1'') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{NNaO}_7^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 612.38707, gef.: 612.38779 ($|\Delta m/z| = 1.18$ ppm).

**(2*S*,3*R*)-2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-18-hydroxyoctadecan-1,3-diyldiacetat /
1,3-Di-OAc-*N*-Boc- ω -OH-Sphinganin (102)**



Zu einer im Ultraschallbad (10 min) entgasten Lösung aus 270 mg (458 μmol , 1.00 Äq.) des olefinischen Benzylethers **101** in EtOH (10 mL) und EtOAc (10 mL) wurden unter Rühren portionsweise 24.4 mg (10 Gew.-%, 22.9 μmol , 0.05 Äq.) Pd/C gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 d bei RT unter H_2 -Atmosphäre kräftig gerührt. Die Mischung wurde daraufhin über Kieselgel (3 cm) filtriert und mit EtOAc (200 mL) eluiert. Die Lösungsmittel des Filtrats wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 229 mg (456 μmol , quant.) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{NO}_7$ (501.71 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

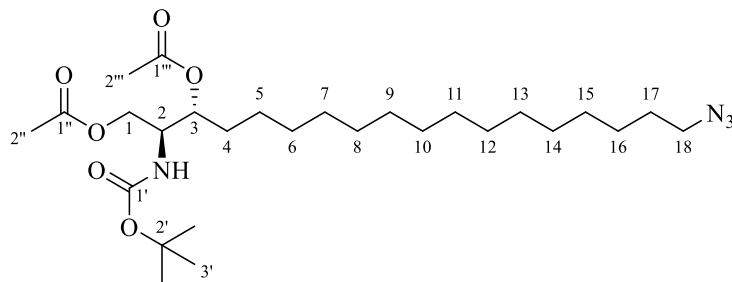
R_f (Cy/EtOAc 3:1, KMnO_4): 0.09.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.23\text{--}1.35$ (m, 24H, $H\text{-}5\text{--}16$), 1.43 (s, 9H, $H\text{-}3'$), 1.48 (br s, 1H, OH), 1.52–1.61 (m, 4H, $H\text{-}4$, $H\text{-}17$), 2.05 (s, 6H, $H\text{-}2''$, $H\text{-}2'''$), 3.62 (t, $^3J_{18,17} = 6.7$ Hz, 2H, $H\text{-}18$), 4.19 (br dd, $^2J_{1a,1b} = 11.7$ Hz, $^3J_{1a,2} = 6.3$ Hz, 1H, $H\text{-}1_a$), 4.01–4.07 (m, 2H, $H\text{-}1_b$, $H\text{-}2$), 4.80 (br d, $^3J_{\text{NH},2} = 9.4$ Hz, 1H, NH), 4.91 (app q, $J = 6.2$ Hz, 1H, $H\text{-}3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 21.0$ ($C\text{-}2''$ od. $C\text{-}2'''$), 21.2 ($C\text{-}2''$ od. $C\text{-}2'''$), 25.9 ($C\text{-}16$), 28.4 (3C, $C\text{-}3'$), 25.3, 29.5, 29.6, 29.7, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 11C, $C\text{-}5\text{--}15$), 31.3 ($C\text{-}4$), 32.9 ($C\text{-}17$), 51.6 ($C\text{-}2$), 63.1 ($C\text{-}1$), 63.2 ($C\text{-}18$), 73.8 ($C\text{-}3$), 80.0 ($C\text{-}2'$), 155.4 ($C\text{-}1'$), 170.7 ($C\text{-}1''$), 171.0 ($C\text{-}1'''$) ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{NNaO}_7^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 524.35577, gef.: 524.35698 ($|\Delta m/z| = 2.29$ ppm).

**(2*S*,3*R*)-18-Azido-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)octadecan-1,3-diylldiacetat /
1,3-Di-OAc-*N*-Boc- ω -Azidosphinganin (104)**



Zu einer Lösung aus 1.86 g (3.71 mmol, 1.00 Äq.) des Alkohols **102**, 1.55 mL (5.56 mmol, 3.00 Äq.) NEt_3 und 22.6 mg (185 μmol , 0.05 Äq.) DMAP in trockenem DCM (25 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 439 μL (5.56 mmol, 1.50 Äq.) Mesylchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und daraufhin mit H_2O (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (4 x 30 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit ges. NH_4Cl -Lösung (25 mL) und ges. NaCl -Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt, wobei das Mesyl-Rohprodukt **103** als gelber Feststoff erhalten wurde.

Das Rohprodukt wurde unter Schutzgasatmosphäre in trockenem DMF (35 mL) gelöst und mit 723 mg (11.1 mmol, 3.00 Äq.) NaN_3 versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei 60 °C gerührt, daraufhin auf RT gebracht und mit H_2O (150 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl -Lösung (50 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.65 g (3.31 mmol, 84 % über 2 Stufen) eines farblosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_6$ (526.72 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 4:1, KMnO_4): 0.41.

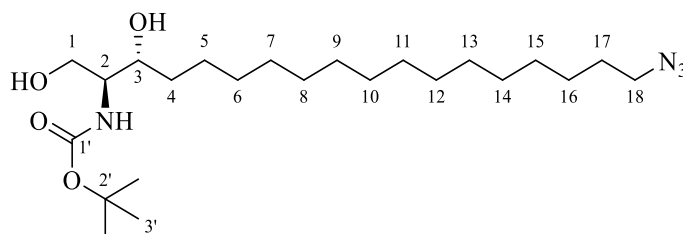
¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 1.23–1.26 (m, 24H, *H*-5–16), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 1.55–1.62 (m, 4H, *H*-4, *H*-17), 2.05 (s, 6H, *H*-2", *H*-2'''), 3.24 (t, $^3J_{18,17} = 7.0$ Hz, 2H, *H*-18), 4.00–4.07 (m, 2H, *H*-1_a, *H*-2), 4.19 (br dd, $^2J_{1b,1a} = 11.7$ Hz, $^3J_{1b,2} = 6.3$ Hz, 1H, *H*-1_b), 4.79 (br d, $^3J_{\text{NH},2} = 9.4$ Hz, 1H, NH), 4.91 (app q, $J = 6.2$ Hz, 1H, *H*-3) ppm.

¹³C-NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 20.9 (*C*-2" od. *C*-2'''), 21.1 (*C*-2" od. *C*-2'''), 26.8 (*C*-16), 28.4 (3C, *C*-3'), 29.0 (*C*-17), 25.3, 29.3, 29.5, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 11C, *C*-5–15), 31.3

(C-4), 51.6 (C-2), 51.6 (C-18), 63.1 (C-1), 73.8 (C-3), 80.0 (C-2'), 155.4 (C-1'), 170.7 (C-1''), 171.0 (C-1''') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₂₇H₅₀N₄NaO₆⁺ [M+Na]⁺: 549.36226, gef.: 549.36375 (|Δm/z| = 2.72 ppm).

**tert-Butyl((2S,3R)-18-azido-1,3-dihydroxyoctadecan-2-yl)carbamate /
N-Boc-ω-Azidosphinganin (96)**



Zu einer Lösung aus 90.0 mg (171 μmol, 1.00 Äq.) des Azids **104** in trockenem MeOH (15 mL) wurden unter Schutzgasatmosphäre 34.2 μL (0.5 M in MeOH, 17.1 μmol, 0.10 Äq.) NaOMe-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und daraufhin mit saurem Ionentauscher (Dowex 50W-X8) neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit MeOH (50 mL) gewaschen und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 75.5 mg (171 μmol, quant.) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₃H₄₆N₄O₄ (442.65 g·mol⁻¹).

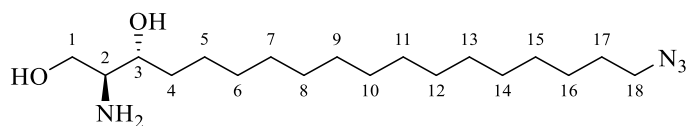
R_f (Cy/EtOAc 2:1, KMnO₄): 0.12.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 1.25–1.38 (m, 22H, H-6–16), 1.45 (s, 9H, H-3'), 1.50–1.63 (m, 6H, H-4, H-5, H-17), 2.40 (d, ³J_{OH,3} = 6.2 Hz, 1H, C-3-OH), 2.50 (br dd, ³J_{OH,1a} = 6.6 Hz, ³J_{OH,1b} = 3.7 Hz, 1H, C-1-OH), 3.25 (t, ³J_{18,17} = 7.0 Hz, 2H, H-18), 3.51–3.54 (m, 1H, H-2), 3.73–3.82 (m, 2H, H-1_a, H-3), 4.00 (ddd, ²J_{1b,1a} = 11.4 Hz, ³J_{1b,2} = 3.7 Hz, ³J_{1b,OH} = 3.7 Hz, 1H, H-1_b), 5.39 (br d, ³J_{NH,2} = 7.4 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 26.1 (C-5), 26.8 (C-16), 28.5 (3C, C-3'), 29.0 (C-17), 26.7, 29.3, 29.6, 29.7, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 10C, C-6–15), 34.6 (C-4), 51.6 (C-18), 54.8 (C-2), 62.8 (C-1), 74.6 (C-3), 79.9 (C-2'), 156.2 (C-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $C_{23}H_{46}N_4NaO_4^+$ $[M+Na]^+$: 465.34113, gef.: 465.34034 ($|\Delta m/z| = 1.70$ ppm).

(2*S*,3*R*)-2-Amino-18-azidooctadecane-1,3-diol / ω -Azidosphinganin (93)



Zu einer Lösung aus 100 mg (226 μ mol) des Carbamats **96** in trockenem MeOH (6 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 700 μ L Acetylchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und alle flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt, das Rohprodukt in DCM (20 mL) gelöst und mit ges. NaHCO₃-Lösung (40 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (4 x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 50.9 mg (149 μ mol, 66 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₁₈H₃₈N₄O₂ (342.53 g·mol⁻¹).

R_f (DCM/MeOH/NEt₃ 9:1:0.05, Ninhydrin): 0.23.

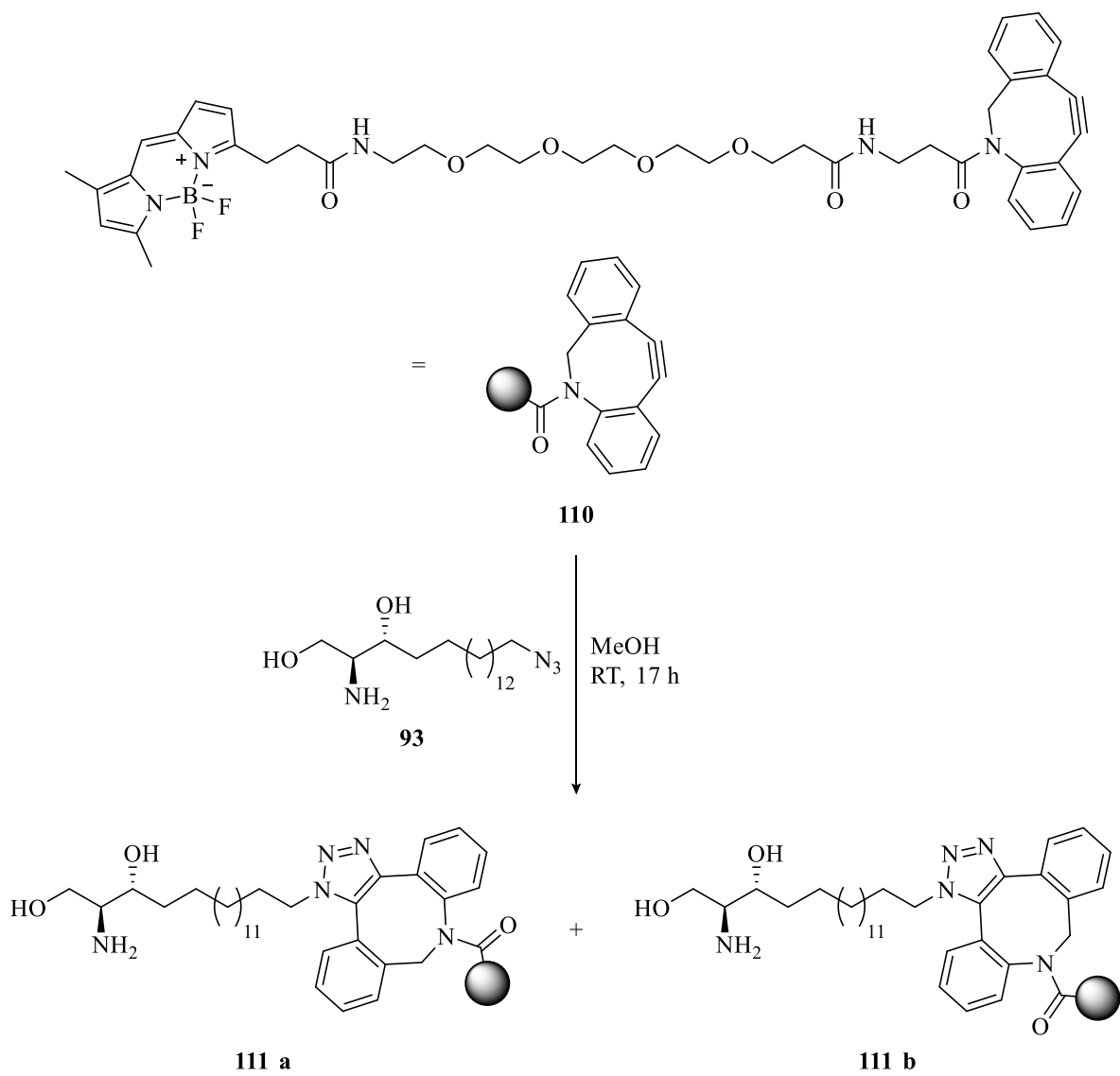
¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ = 1.30–1.44 (m, 24H, *H*-4_a, *H*-5_a, *H*-6–16), 1.54–1.61 (m, 4H, *H*-4_b, *H*-5_b, *H*-17), 2.71 (ddd, ³*J*_{2,1a} = 7.6 Hz, ³*J*_{2,3} = 5.3 Hz, ³*J*_{2,1b} = 4.2 Hz, 1H, *H*-2), 3.28 (t, ³*J*_{18,17} = 6.9 Hz, 2H, *H*-18), 3.47 (dd, ²*J*_{1a,1b} = 10.9 Hz, ³*J*_{1a,2} = 7.6 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.49–3.52 (m, 1H, *H*-3), 3.73 (dd, ²*J*_{1b,1a} = 10.9 Hz, ³*J*_{1b,2} = 4.2 Hz, 1H, *H*-1_b) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ = 27.1 (*C*-5), 27.8 (*C*-16), 29.9 (*C*-17), 30.3, 30.7, 30.7, 30.8, 30.8, 30.8 (zus. 10C, *C*-6–15), 34.3 (*C*-4), 52.4 (*C*-18), 58.1 (*C*-2), 64.3 (*C*-1), 74.0 (*C*-3) ppm.

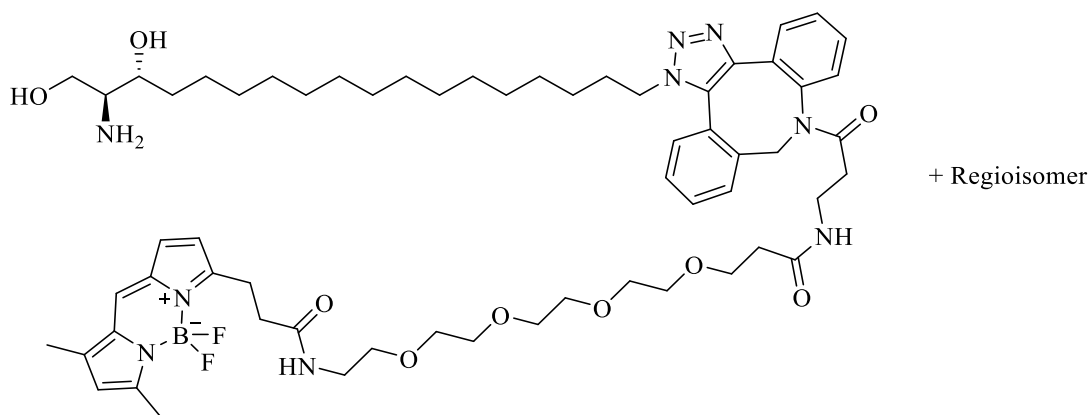
¹⁵N-NMR (CD₃OD, 60 MHz): δ = -360.0 (NH₂), -310.4 (*C*-N-N-N), -171.9 (*C*-N-N-N), -132.5 (*C*-N-N-N) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₁₈H₃₉N₄O₂⁺ $[M+H]^+$: 343.30675, gef.: 343.30675 ($|\Delta m/z| = 0.02$ ppm).

7.2.10 Sphinganin-Click-Modifikation



Sphinganin-BODIPY-Konjugat **111**



In ein 1.5 mL-Mikroreaktionsgefäß wurden nacheinander folgende Reagenzien (in MeOH) gegeben:

Reagenz	$c_{\text{Maßlösung}} [\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}]$	$V_{\text{eingesetzt}} [\mu\text{L}]$	Stoffmenge	Äq.
ω -N ₃ -Sphinganin (93)	2.86	100	836 nmol	1.00
BDP-FL-PEG ₄ -DBCO (110)	2.50	400	1.25 μmol	1.50

Das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei 20 °C unter Lichtausschluss geschüttelt (800 rpm). Die massenspektrometrische Reaktionskontrolle (8 μL der Reaktionslösung + 992 μL MeOH) und die Dünnschichtchromatographie zeigte den Umsatz zum Click-Produkt **111**. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

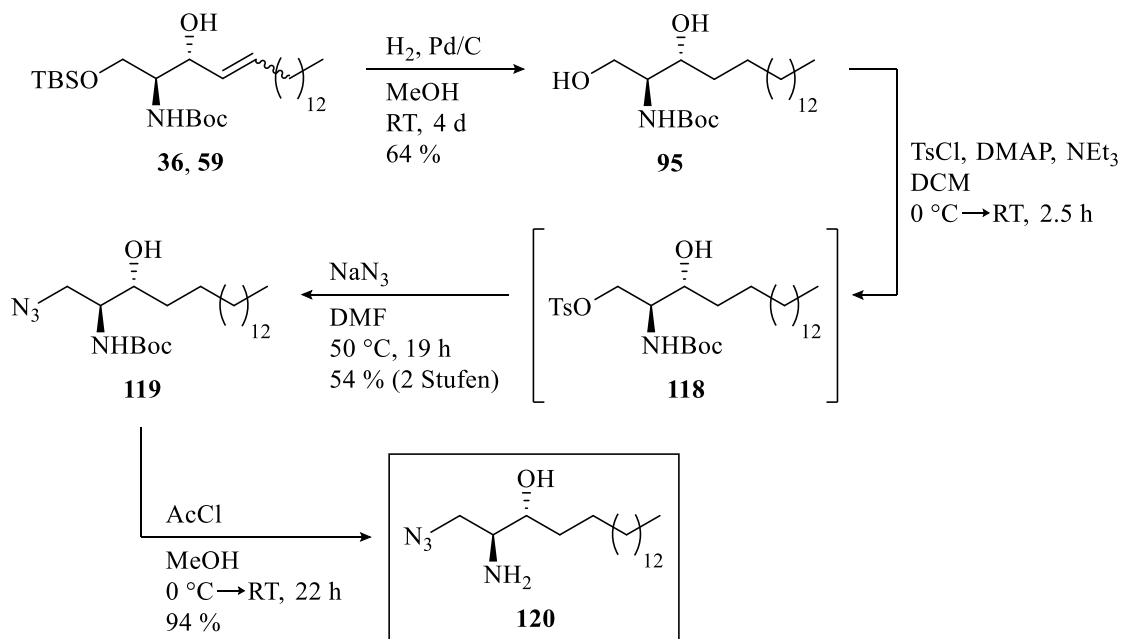
Summenformel: C₆₁H₈₈BF₂N₉O₉ (1140.24 g·mol⁻¹).

R_f (CHCl₃/MeOH/H₂O 3:1:0.1, Alox, UV): 0.19.

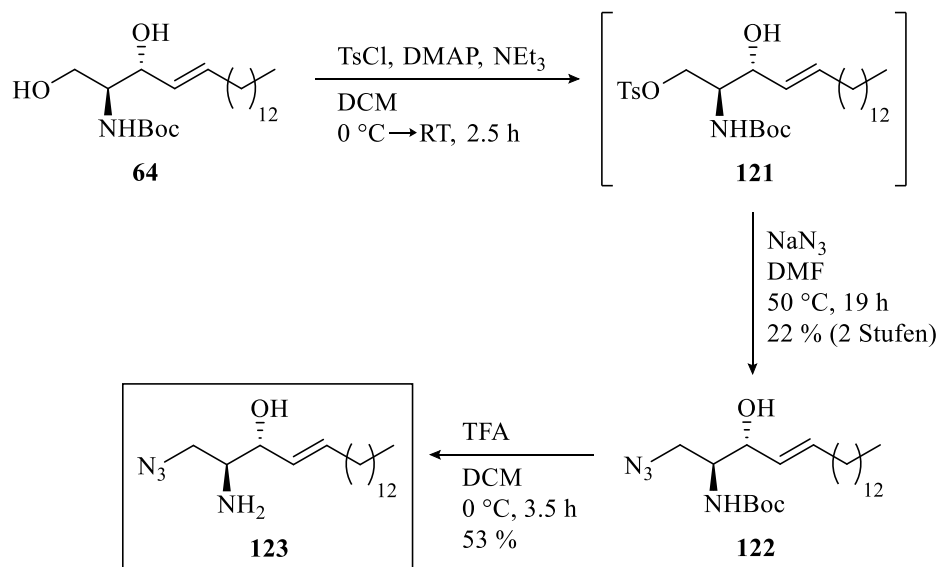
HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₆₁H₈₈BF₂N₉NaO₉⁺ [M+Na]⁺: 1162.6658, gef.: 1162.6630 (| $\Delta m/z$ | = 3.3 ppm).

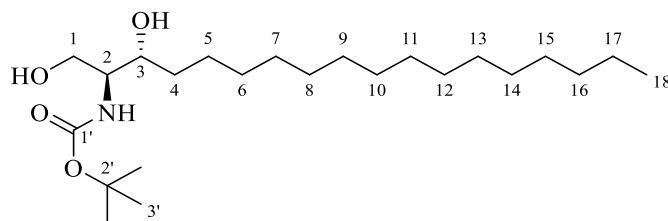
7.2.11 Synthese der 1-Azidosphingolipide

1-Azido-Sphingarin:



1-Azido-Sphingosin:



***tert*-Butyl((2*S*,3*R*)-1,3-dihydroxyoctadecan-2-yl)carbamat / *N*-Boc-Sphingalin (95)**

Zu einer im Ultraschallbad (20 min) entgasten Lösung aus 3.20 g (6.23 mmol, 1.00 Äq.) der olefinischen Silylether **36** und **59** (*E/Z*-Isomerengemisch) in MeOH (50 mL) wurden unter Rühren portionsweise 663 mg (10 Gew.-%, 623 μ mol, 0.10 Äq.) Pd/C gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 d bei RT unter H₂-Atmosphäre kräftig gerührt. Die Mischung wurde daraufhin über Celite (3 cm) filtriert und mit MeOH (200 mL) eluiert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand zweimal säulenchromatographisch an Kieselgel (1. Cy/EtOAc 4:1→2:1, 2. CHCl₃/MeOH 25:0.1→40:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.60 g (3.97 mmol, 64 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₃H₄₇NO₄ (401.63 g·mol⁻¹).

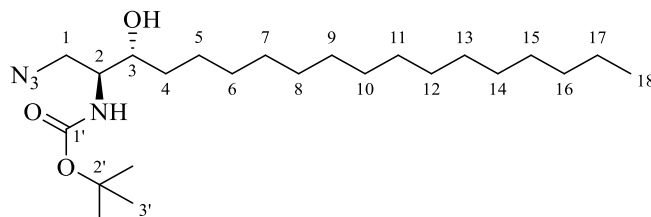
R_f (CHCl₃/MeOH 40:1, KMnO₄): 0.08.

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 0.90 (t, ³J_{18,17} = 6.9 Hz, 3H, *H*-18), 1.29–1.41 (m, 26H, *H*-4_a, *H*-5_a, *H*-6–17), 1.45 (s, 9H, *H*-3'), 1.51–1.60 (m, 2H, *H*-4_b, *H*-5_b), 3.44–3.49 (m, 1H, *H*-2), 3.53–3.58 (m, 1H, *H*-3), 3.65 (dd, ²J_{1a,1b} = 11.3 Hz, ³J_{1a,2} = 5.8 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.69 (dd, ²J_{1b,1a} = 11.3 Hz, ³J_{1b,2} = 4.5 Hz, 1H, *H*-1_b) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ = 14.5 (*C*-18), 23.8 (*C*-17), 26.8 (*C*-5), 28.8 (3*C*, *C*-3'), 30.5, 30.7, 30.8, 30.8 (zus. 10*C*, *C*-6–15), 33.1 (*C*-16), 34.8 (*C*-4), 57.9 (*C*-2), 62.6 (*C*-1), 72.8 (*C*-3), 80.1 (*C*-2'), 158.3 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₃H₄₇NNaO₄⁺ [M+Na]⁺: 424.3397, gef.: 424.3395 (| $\Delta m/z$ | = 0.4 ppm); *m/z* ber. für C₄₆H₉₄N₂NaO₈⁺ [2M+Na]⁺: 825.6902, gef.: 825.6898 (| $\Delta m/z$ | = 0.5 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[316,317,470,484]

tert*-Butyl((2*S*,3*R*)-1-azido-3-hydroxyoctadecan-2-yl)carbamat /*1-Azido-*N*-Boc-Sphinganin (119)**

Zu einer Lösung aus 500 mg (1.24 mmol, 1.00 Äq.) des Diols **95**, 260 μL (1.87 mmol, 1.50 Äq.) NEt_3 und 76.0 mg (622 μmol , 0.50 Äq.) DMAP in trockenem DCM (30 mL) wurde bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre innerhalb von 15 min tropfenweise eine Lösung aus 237 mg (1.24 mmol, 1.00 Äq.) Tosylchlorid in trockenem DCM (15 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h bei RT gerührt und daraufhin mit H_2O (30 mL) und 0.1 M HCl (0.1 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (5 x 25 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt, wobei das Tosyl-Rohprodukt **118** als hellgelber Feststoff erhalten wurde.

Das Rohprodukt wurde in DMF (18 mL) gelöst und mit 243 mg (3.73 mmol, 3.00 Äq.) NaN_3 versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei 50 °C gerührt und auf RT gebracht. Nach der Zugabe von H_2O (50 mL) und ges. NaCl-Lösung (5 mL) wurde mit DCM (7 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der hellgelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 15:1 \rightarrow 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 286 mg (670 μmol , 54 % über 2 Stufen) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_3$ (426.65 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 10:1, Ninhydrin): 0.13.

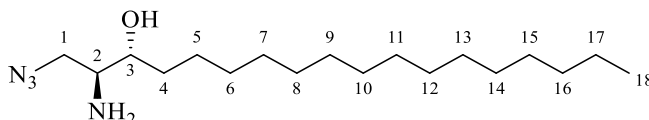
$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ = 0.90 (t, $^3J_{18,17}$ = 6.9 Hz, 3H, *H*-18), 1.29–1.40 (m, 26H, *H*-6–17, *H*-4_a, *H*-5_a), 1.45–1.61 (m, 11H, *H*-3', *H*-4_b, *H*-5_b), 3.38–3.49 (m, 3H, *H*-1, *H*-2), (app td, J = 7.6 Hz, J = 3.6 Hz, 1H, *H*-3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz): δ = 14.5 (*C*-18), 23.8 (*C*-17), 26.5 (*C*-5), 28.8 (3*C*, *C*-3'), 30.5, 30.7, 30.7, 30.8, 30.8 (zus. 10*C*, *C*-6–15), 33.1 (*C*-16), 34.9 (*C*-4), 53.0 (*C*-1), 56.8 (*C*-2), 72.5 (*C*-3), 80.3 (*C*-2'), 158.1 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $C_{23}H_{46}N_4NaO_3^+$ $[M+Na]^+$: 449.3462, gef.: 449.3455 ($|\Delta m/z| = 1.7$ ppm); m/z ber. für $C_{46}H_{92}N_8NaO_6^+$ $[2M+Na]^+$: 875.7032, gef.: 875.7027 ($|\Delta m/z| = 0.5$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[316,317]

(2*S*,3*R*)-2-Amino-1-azidooctadecan-3-ol / 1-Azidosphingarin (120)



Zu einer Suspension aus 140 mg (328 μ mol) des Carbamats **119** in trockenem MeOH (15 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 500 μ L Acetylchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 7 h bei RT gerührt, wobei eine klare Lösung entstand. Nach der Zugabe von weiteren 200 μ L Acetylchlorid wurde das Gemisch 15 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und alle flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt, das Rohprodukt in DCM (30 mL) gelöst und mit ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (5 x 25 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 101 mg (309 μ mol, 94 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₈H₃₈N₄O (326.53 g·mol⁻¹).

R_f (DCM/MeOH/25 % NH₃ 19:1:0.02, Ninhydrin): 0.21.

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 0.90 (t, ³J_{18,17} = 6.9 Hz, 3H, H-18), 1.29–1.43 (m, 26H, H-6–17, H-4_a, H-5_a), 1.54–1.61 (m, 2H, H-4_b, H-5_b), 2.74 (ddd, ³J_{2,1a} = 7.6 Hz, ³J_{2,3} = 5.8 Hz, ³J_{2,1b} = 4.0 Hz, 1H, H-2), 3.35 (dd, ²J_{1a,1b} = 12.3 Hz, ³J_{1a,2} = 7.6 Hz, 1H, H-1_a), 3.46 (ddd, ³J_{3,4a od. b} = 8.7 Hz, ³J_{3,2} = 5.8 Hz, ³J_{3,4a od. b} = 2.8 Hz, 1H, H-3), 3.57 (dd, ²J_{1b,1a} = 12.3 Hz, ³J_{1b,2} = 4.0 Hz, 1H, H-1_b) ppm.

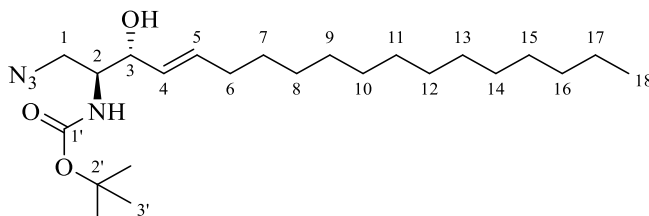
¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ = 14.5 (C-18), 23.8 (C-17), 27.0 (C-5), 30.5, 30.8, 30.8, 30.8 (zus. 10C, C-6–15), 33.1 (C-16), 34.3 (C-4), 55.1 (C-1), 56.5 (C-2), 73.8 (C-3) ppm.

¹⁵N-NMR (CD₃OD, 40 MHz): δ = -357.9 (NH₂), -315.5 (C-N-N-N), -173.3 (C-N-N-N), -132.8 (C-N-N-N) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₃₉N₄O⁺ [M+H]⁺: 327.31184, gef.: 327.31215 (|Δ*m/z*| = 0.96 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[316,317]

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-1-azido-3-hydroxyoctadec-4-en-2-yl)carbamat /
1-Azido-*N*-Boc-Sphingosin (**122**)**



Zu einer Lösung aus 500 mg (1.25 mmol, 1.00 Äq.) des Diols **64**, 262 μL (1.88 mmol, 1.50 Äq.) NEt₃ und 76.4 mg (626 μmol, 0.50 Äq.) DMAP in trockenem DCM (20 mL) wurde bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre innerhalb von 5 min tropfenweise eine Lösung aus 239 mg (1.25 mmol, 1.00 Äq.) Tosylchlorid in trockenem DCM (10 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h bei RT gerührt und daraufhin mit H₂O (30 mL) und 0.1 M HCl (0.1 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (6 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt, wobei das Tosyl-Rohprodukt **121** als hellgelbes Öl erhalten wurde.

Das Rohprodukt wurde in DMF (18 mL) gelöst und mit 488 mg (7.51 mmol, 6.00 Äq.) NaN₃ versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei 50 °C gerührt, daraufhin auf RT gebracht und mit H₂O (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit DCM (7 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe, ölige Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 20:1→10:1) gereinigt.

Ausbeute: 117 mg (275 μmol, 22 % über 2 Stufen) eines hellgelben, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: C₂₃H₄₄N₄O₃ (424.63 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 10:1, Ninhydrin): 0.14.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.87 (t, ³J_{18,17} = 6.9 Hz, 3H, *H*-18), 1.25–1.31 (m, 20H, *H*-8–17), 1.33–1.38 (m, 2H, *H*-7), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 2.04 (app q, *J* = 7.0 Hz, 2H, *H*-6), 2.33

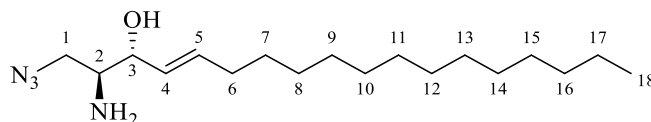
(br s, 1H, OH), 3.48 (dd, $^2J_{1a,1b} = 12.4$ Hz, $^3J_{1a,2} = 4.0$ Hz, 1H, H-1_a), 3.58 (br dd, $^2J_{1b,1a} = 12.4$ Hz, $^3J_{1b,2} = 5.2$ Hz, 1H, H-1_b), 3.70–3.76 (m, 1H, H-2), 4.16 (app br t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-3), 4.94 (br d, $^3J_{NH,2} = 7.8$ Hz, 1H, NH), 5.45 (ddt, $^3J_{4,5} = 15.4$ Hz, $^3J_{4,3} = 6.7$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.4$ Hz, 1H, H-4), 5.75 (dtd, $^3J_{5,4} = 15.4$ Hz, $^3J_{5,6} = 6.8$ Hz, $^4J_{5,3} = 1.1$ Hz, 1H, H-5) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = 14.3$ (C-18), 22.8 (C-17), 28.5 (3C, C-3'), 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 32.1 (zus. 10C, C-6–15), 32.4 (C-16), 51.3 (C-1), 54.3 (C-2), 73.6 (C-3), 80.1 (C-2'), 128.6 (C-4), 135.1 (C-5), 155.8 (C-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₂₃H₄₄N₄NaO₃⁺ [M+Na]⁺: 447.3306, gef.: 447.3303 ($|\Delta m/z| = 0.6$ ppm); m/z ber. für C₄₆H₈₈N₈NaO₆⁺ [2M+Na]⁺: 871.6719, gef.: 871.6720 ($|\Delta m/z| = 0.2$ ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[316,317]

(2*S*,3*R*,*E*)-2-Amino-1-azidooctadec-4-en-3-ol / 1-Azidosphingosin (**123**)



Zu einer Lösung aus 150 mg (353 μmol) des Carbamats **122** in DCM (4.5 mL) wurden bei 0 °C 600 μL TFA gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3.5 h bei 0 °C gerührt und daraufhin mit 0.5 M NaOH (25 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (8 x 15 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe, ölige Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH/25 % NH₃ 60:1:0.02) gereinigt. Das Rohprodukt wurde in H₂O (10 mL) suspendiert und mit DCM (8 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 61.2 mg (189 μmol , 53 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₈H₃₆N₄O (324.51 g·mol⁻¹).

R_f (DCM/MeOH/25 % NH₃ 19:1:0.02, Ninhydrin): 0.24.

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 0.90 (t, $^3J_{18,17}$ = 6.9 Hz, 3H, *H*-18), 1.29–1.35 (m, 20H, *H*-8–17), 1.39–1.46 (m, 2H, *H*-7), 2.06–2.12 (m, 2H, *H*-6), 2.79 (ddd, $^3J_{2,1a}$ = 7.1 Hz, $^3J_{2,3}$ = 6.2 Hz, $^3J_{2,1b}$ = 4.3 Hz, 1H, *H*-2), 3.34 (dd, $^2J_{1a,1b}$ = 12.3 Hz, $^3J_{1a,2}$ = 7.1 Hz, 1H, *H*-1_a, teilweise Überlagerung mit Restprotonensignal von CD₃OD), 3.51 (dd, $^2J_{1b,1a}$ = 12.3 Hz, $^3J_{1b,2}$ = 4.3 Hz, 1H, *H*-1_b), 3.90–3.94 (m, 1H, *H*-3), 5.48 (ddt, $^3J_{4,5}$ = 15.4 Hz, $^3J_{4,3}$ = 7.5 Hz, $^4J_{4,6}$ = 1.4 Hz, 1H, *H*-4), 5.75 (dtd, $^3J_{5,4}$ = 15.4 Hz, $^3J_{5,6}$ = 6.8 Hz, $^4J_{5,3}$ = 0.9 Hz, 1H, *H*-5) ppm.

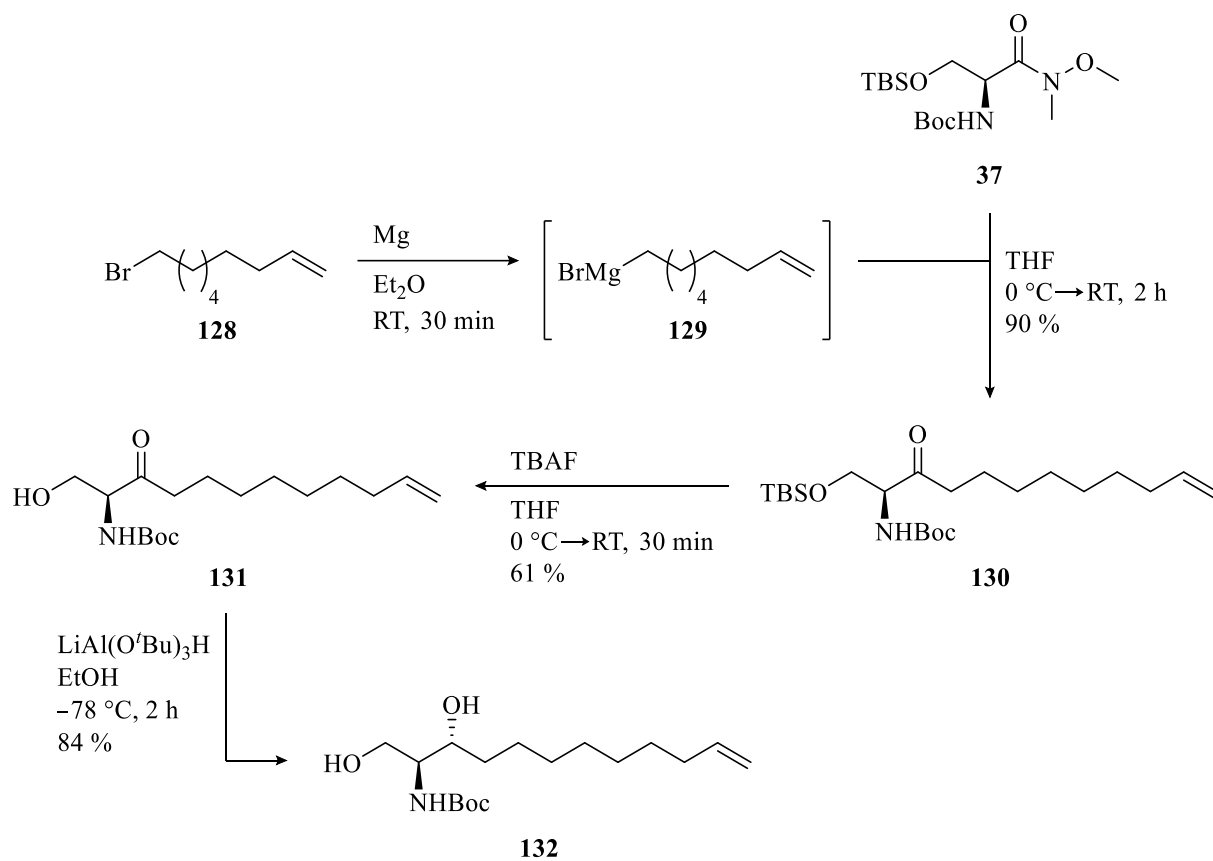
¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ = 14.5 (*C*-18), 23.8 (*C*-17), 30.3 (*C*-7), 30.5, 30.6, 30.8, 30.8, 30.8, 30.8 (zus. 8C, *C*-8–15), 33.1 (*C*-16), 33.4 (*C*-6), 55.0 (*C*-1), 56.3 (*C*-2), 75.2 (*C*-3), 130.5 (*C*-4), 135.8 (*C*-5) ppm.

¹⁵N-NMR (CD₃OD, 40 MHz): δ = -359.1 (NH₂), -315.6 (C-N-N-N), -173.0 (C-N-N-N), -133.0 (C-N-N-N) ppm.

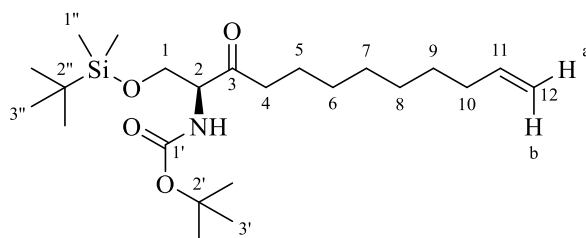
HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₃₇N₄O⁺ [M+H]⁺: 325.29619, gef.: 325.29554 (| $\Delta m/z$ | = 1.99 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[316,317]

7.2.12 Vorversuche zur Synthese der atypischen Sphingolipide



***tert*-Butyl(*S*)-(1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-oxododec-11-en-2-yl)carbamat /
1-OTBS-*N*-Boc-3-Keto-11-en-C₁₂-Sphinganin (130)**



Zu einer Mischung aus 168 mg (6.91 mmol, 10.0 Äq.) Mg-Spänen und trockenem Et₂O (5 mL) wurde zum Aktivieren des Metalls unter Schutzgasatmosphäre ein Iodkugeln gegeben. Das Gemisch wurde 10 min unter Rückfluss erhitzt und daraufhin im Ultraschallbad (10 min) sonografiert. Es wurden tropfenweise 500 µL einer Lösung aus 1.00 g (3.46 mmol, 5.00 Äq.) des Bromids **128** in trockenem Et₂O (5 mL) zugegeben. Um die Reaktion zu starten, wurde das Gemisch kurz erwärmt und dann bei RT mit 1,2-Dibromethan (5 Tropfen) versetzt. Danach wurde die verbliebene Bromid-Lösung tropfenweise zugegeben, sodass die Reaktionsmischung kontinuierlich schwach siedete. Nach vollständiger Zugabe des Bromids **128** wurde das Gemisch 30 min bei RT gerührt. Die entstandene graue Grignard-Lösung (**129**) wurde bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre zu einer Lösung aus 251 mg (691 µmol, 1.00 Äq.) des geschützten Weinreb-Amids **37** in trockenem THF (20 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und daraufhin mit 1 M HCl (30 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (4 x 20 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:0→9:1) gereinigt.

Ausbeute: 320 mg (625 µmol, 90 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₃H₄₅NO₄Si (427.70 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 9:1, KMnO₄): 0.49.

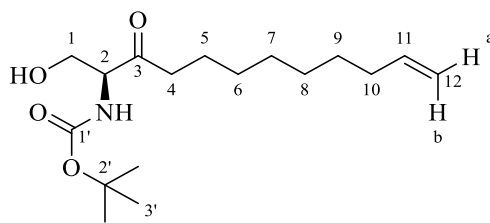
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.02 (s, 6H, *H*-1''), 0.84 (s, 9H, *H*-3''), 1.25–1.29 (m, 6H, *H*-6–8), 1.34–1.39 (m, 2H, *H*-9), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 1.56–1.61 (m, 2H, *H*-5), 1.99–2.05 (m, 2H, *H*-10), 2.45 (dt, ²*J*_{4a,4b} = 17.3 Hz, ³*J*_{4a,5} = 7.3, 1H, *H*-4_a), 2.57 (dt, ²*J*_{4b,4a} = 17.3 Hz, ³*J*_{4b,5} = 7.5 Hz, 1H, *H*-4_b), 3.81 (dd, ²*J*_{1a,1b} = 10.4 Hz, ³*J*_{1a,2} = 4.0 Hz, 1H, *H*-1_a), 4.40 (dd, ²*J*_{1b,1a} = 10.4 Hz, ³*J*_{1b,2} = 3.1 Hz, 1H, *H*-1_b), 4.23–4.27 (m, 1H, *H*-2), 4.90–4.94 (m, 1H, *H*-12_a),

4.95–5.01 (m, 1H, *H*-12_b), 5.48 (br d, $^3J_{\text{NH},2} = 7.3$ Hz, 1H, *NH*), 5.79 (ddt, $^3J_{11,12\text{b}} = 17.0$ Hz, $^3J_{11,12\text{a}} = 10.3$ Hz, $^3J_{11,10} = 6.7$ Hz, 1H, *H*-11) ppm.

^{13}C -NMR (CDCl₃, 100 MHz): $\delta = -5.5$ (*C*-1''), -5.5 (*C*-1''), 18.3 (*C*-2''), 23.4 (*C*-5), 25.9 (3*C*, *C*-3''), 28.5 (3*C*, *C*-3'), 29.0 (*C*-9), 29.0 (*C*-7 od. *C*-8), 29.3 (*C*-6), 29.4 (*C*-7 od. *C*-8), 33.9 (*C*-10), 40.2 (*C*-4), 61.3 (*C*-2), 63.6 (*C*-1), 79.8 (*C*-2'), 114.3 (*C*-12), 139.3 (*C*-11), 155.5 (*C*-1'), 208.1 (*C*-3) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₂₃H₄₅NNaO₄Si⁺ [M+Na]⁺: 450.30101, gef.: 450.30130 (| $\Delta m/z$ | = 0.65 ppm).

***tert*-Butyl(*S*)-(1-hydroxy-3-oxododec-11-en-2-yl)carbammat /
N-Boc-3-Keto-11-en-C₁₂-Sphinganin (131)**



Zu einer Lösung aus 1.79 g (4.19 mmol, 1.00 Äq.) des Silylethers **130** in trockenem THF (20 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 5.02 mL (1 M in THF, 5.02 mmol, 1.20 Äq.) TBAF-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und daraufhin mit H₂O (50 mL) und ges. NH₄Cl-Lösung (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (3 x 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 801 mg (2.56 mmol, 61 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₇H₃₁NO₄ (313.44 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 2:1, KMnO₄): 0.45.

^1H -NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 1.26$ – 1.29 (m, 6H, *H*-6–8), 1.32 – 1.39 (m, 2H, *H*-9), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 1.55 – 1.62 (m, 2H, *H*-5), 1.99 – 2.05 (m, 2H, *H*-10), 2.48 – 2.63 (m, 2H, *H*-4), 2.69 – 2.72 (m, 1H, *OH*), 3.86 – 3.97 (m, 2H, *H*-1), 4.32 – 4.33 (m, 1H, *H*-2), 4.90 – 4.93 (m, 1H,

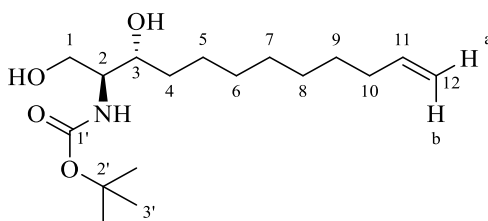
$H-12_a$), 4.95–5.00 (m, 1H, $H-12_b$), 5.65 (br d, $^3J_{NH,2} = 5.5$ Hz, 1H, NH), 5.79 (ddt, $^3J_{11,12b} = 17.0$ Hz, $^3J_{11,12a} = 10.3$ Hz, $^3J_{11,10} = 6.7$ Hz, 1H, $H-11$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 23.5$ (C-5), 28.4 (3C, C-3'), 28.9 (C-9), 29.0 (C-7 od. C-8), 29.2 (C-6), 29.3 (C-7 od. C-8), 33.9 (C-10), 40.0 (C-4), 61.7 (C-2), 63.4 (C-1), 80.4 (C-2'), 114.3 (C-12), 139.2 (C-11), 156.1 (C-1'), 208.0 (C-3) ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{NNaO}_4^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 336.21453, gef.: 336.21418 ($|\Delta m/z| = 1.05$ ppm).

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*)-1,3-dihydroxydodec-11-en-2-yl)carbamat /**

***N*-Boc-11-en- C_{12} -Sphinganin (132)**



Zu einer Lösung aus 673 mg (2.15 mmol, 1.00 Äq.) des Ketons **131** in EtOH (25 mL) wurden bei -78 °C innerhalb von 1.5 h portionsweise 1.09 g (4.29 mmol, 2.00 Äq.) $\text{LiAl}(\text{O}^t\text{Bu})_3\text{H}$ gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei -78 °C gerührt und daraufhin mit 1 M HCl (10 mL), H_2O (50 mL) und ges. NH_4Cl -Lösung (50 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (3 x 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit ges. NaHCO_3 -Lösung (20 mL) und ges. NaCl -Lösung (30 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 3:1 \rightarrow 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 567 mg (1.80 mmol, 84 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{NO}_4$ (315.45 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 2:1, KMnO_4): 0.18.

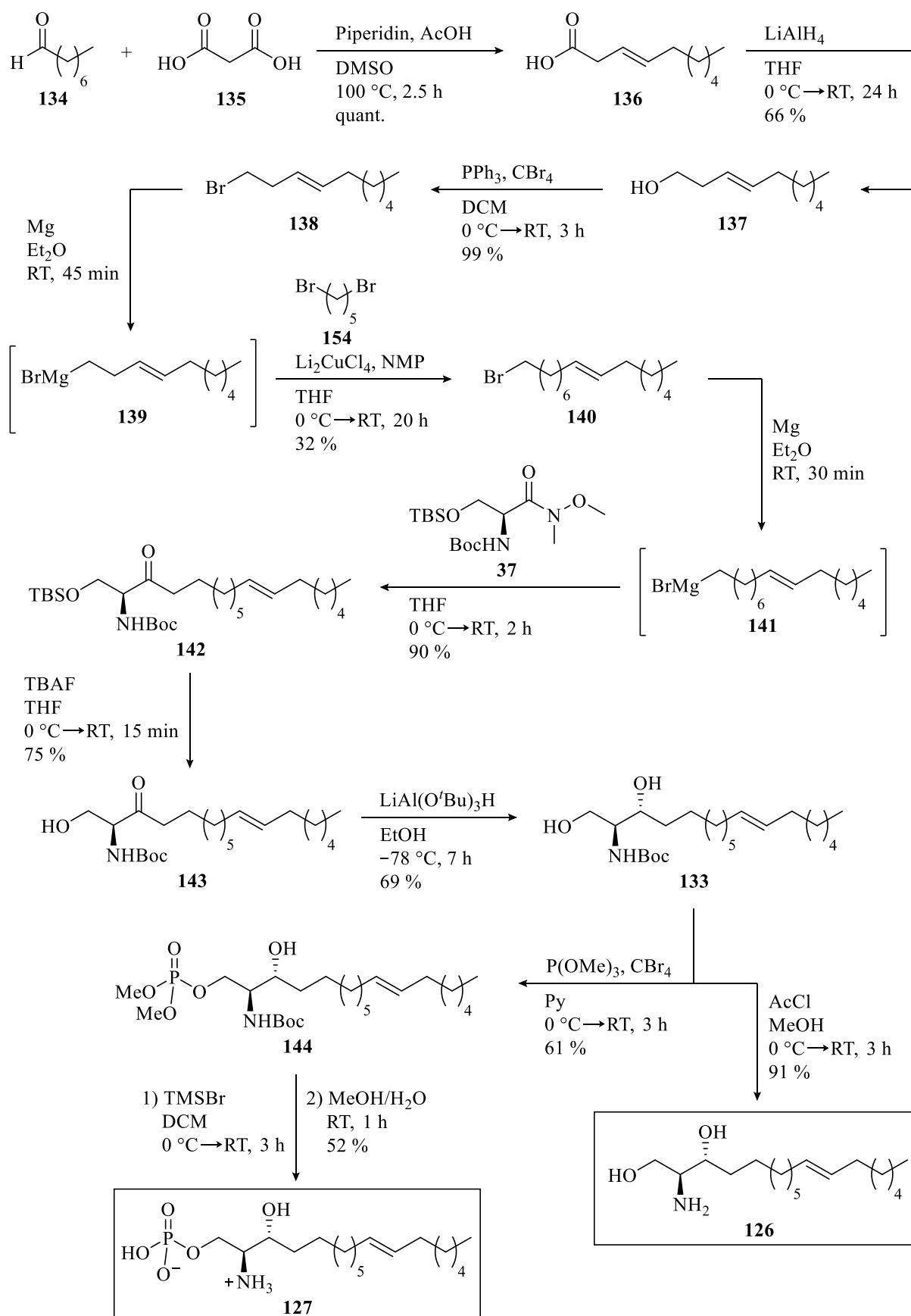
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 1.30$ – 1.39 (m, 9H, $H-5_a$, $H-6$ – 9), 1.45 (s, 9H, $H-3'$), 1.50– 1.55 (m, 3H, $H-5_b$, $H-4$), 2.00– 2.06 (m, 2H, $H-10$), 2.52 (br d, $^3J_{OH,3} = 6.2$ Hz, 1H, OH), 2.62 (br dd, $^3J_{OH,1a} = 6.9$ Hz, $^3J_{OH,1b} = 3.9$ Hz, 1H, OH), 3.51– 3.54 (m, 1H, $H-2$), 3.72– 3.81 (m, 2H, $H-1_a$, $H-3$), 3.99 (ddd, $^2J_{1b,1a} = 11.4$ Hz, $^3J_{1b,2} = 3.9$ Hz, $^3J_{1b,OH} = 3.9$ Hz, 1H, $H-1_b$),

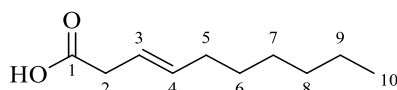
4.91–4.97 (m, 1H, *H*-12_a), 4.96–5.02 (m, 1H, *H*-12_b), 5.40 (br d, $^3J_{NH,2} = 7.4$ Hz, 1H, *NH*), 5.80 (ddt, $^3J_{11,12b} = 17.0$ Hz, $^3J_{11,12a} = 10.3$ Hz, $^3J_{11,10} = 6.7$ Hz, 1H, *H*-11) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 26.1$ (*C*-5), 28.5 (3C, *C*-3'), 29.0 (*C*-9), 29.2 (*C*-6 od. *C*-7 od. *C*-8), 29.5 (*C*-6 od. *C*-7 od. *C*-8), 29.7 (*C*-6 od. *C*-7 od. *C*-8), 33.9 (*C*-10), 34.5 (*C*-4), 54.9 (*C*-2), 62.8 (*C*-1), 74.4 (*C*-3), 79.9 (*C*-2'), 114.3 (*C*-12), 139.3 (*C*-11), 156.2 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI^+): *m/z* ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{NNaO}_4^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 338.23018, gef.: 338.23073 ($|\Delta m/z| = 1.64$ ppm).

7.2.13 Synthese atypischer Sphingolipide: Sphinganin- und S1P-Analoga



(E)-Dec-3-ensäure (136)

Zu einer Mischung aus 20.0 g (156 mmol, 1.00 Äq.) Octanal (**134**) und 19.5 g (187 mmol, 1.20 Äq.) Malonsäure (**135**) in DMSO (60 mL) wurden 155 μL (1.56 mmol, 0.01 Äq.) Piperidin und 89.3 μL (1.56 mmol, 0.01 Äq.) AcOH gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h bei 100 °C gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war und daraufhin bei RT mit H_2O (200 mL) und ges. NaCl-Lösung (200 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 150 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 26.5 g (156 mmol, quant.) eines hellgelben Öls.

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ (170.25 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

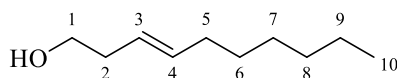
R_f (Cy/EtOAc 2:1, KMnO_4): 0.11.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 0.88 (t, $^3J_{10,9}$ = 6.9 Hz, 3H, *H*-10), 1.22–1.39 (m, 8H, *H*-6–9), 2.00–2.06 (m, 2H, *H*-5), 3.06–3.08 (m, 2H, *H*-2), 5.46–5.54 (m, 1H, *H*-3), 5.56–5.63 (m, 1H, *H*-4), 11.15 (br s, 1H, CO_2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 14.2 (*C*-10), 22.8 (*C*-9), 29.0 (*C*-7), 29.2 (*C*-6), 31.8 (*C*-8), 32.6 (*C*-5), 38.0 (*C*-2), 120.7 (*C*-3), 135.8 (*C*-4), 178.8 (*C*-1) ppm.

HRMS (APCI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 171.1380, gef.: 171.1374 ($|\Delta m/z|$ = 3.51 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[459,460]

(E)-Dec-3-en-1-ol (137)

Zu einer Lösung aus 26.5 g (156 mmol, 1.00 Äq.) der Säure **136** in trockenem THF (200 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre innerhalb von 30 min portionsweise 8.86 g (233 mmol, 1.00 Äq.) LiAlH_4 gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 0 °C und dann

23 h bei RT gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurden nacheinander vorsichtig *i*PrOH (100 mL), H₂O (100 mL) und 1 M HCl (500 mL) zugegeben. Nach der Extraktion mit EtOAc (4 x 200 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 9:1→5:1) gereinigt.

Ausbeute: 16.0 g (102 mmol, 66 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₁₀H₂₀O (156.27 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 5:1, KMnO₄): 0.27.

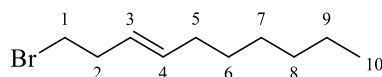
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.88 (t, ³J_{10,9} = 6.9 Hz, 3H, H-10), 1.24–1.36 (m, 8H, H-6–9), 1.98–2.04 (m, 2H, H-5), 2.23–2.28 (m, 2H, H-2), 3.62 (t, ³J_{1,2} = 6.3 Hz, 2H, H-1), 5.37 (dt, ³J_{3,4} = 15.3 Hz, ³J_{3,2} = 7.0 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.4 Hz, 1H, H-3), 5.55 (dt, ³J_{4,3} = 15.3 Hz, ³J_{4,5} = 6.7 Hz, ³J_{4,2} = 1.3 Hz, 1H, H-4) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.2 (C-10), 22.8 (C-9), 29.0 (C-7), 29.6 (C-6), 31.9 (C-8), 32.8 (C-5), 36.1 (C-2), 62.2 (C-1), 125.8 (C-3), 134.6 (C-4) ppm.

HRMS (APCI⁺): m/z ber. für C₁₀H₂₁O⁺ [M+H]⁺: 157.1587, gef.: 157.1582 (| Δ m/z| = 3.18 ppm).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[461,462]

(*E*)-1-Bromdec-3-en (138)



Zu einer Lösung aus 15.0 g (96.0 mmol, 1.00 Äq.) des Alkohols **137** und 35.0 g (106 mmol, 1.10 Äq.) CBr₄ in trockenem DCM (350 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre innerhalb von 1 h portionsweise 27.7 g (106 mmol, 1.10 Äq.) PPh₃ gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand mit Pentan (250 mL) versetzt. Der dabei ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit Pentan (350 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy) gereinigt.

Ausbeute: 20.9 g (95.3 mmol, 99 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Summenformel: C₁₀H₁₉Br (219.17 g·mol⁻¹).

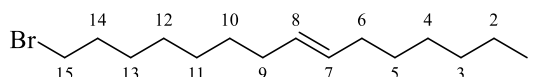
R_f (Cy, KMnO₄): 0.50.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.88 (t, ³J_{10,9} = 6.9 Hz, 3H, H-10), 1.22–1.39 (m, 8H, H-6–9), 1.97–2.03 (m, 2H, H-5), 2.51–2.57 (m, 2H, H-2), 3.36 (t, ³J_{1,2} = 7.2 Hz, 2H, H-1), 5.38 (dt, ³J_{3,4} = 15.3 Hz, ³J_{3,2} = 6.7 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.3 Hz, 1H, H-3), 5.54 (dt, ³J_{4,3} = 15.3 Hz, ³J_{4,5} = 6.7 Hz, ⁴J_{4,2} = 1.2 Hz, 1H, H-4) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.2 (C-10), 22.8 (C-9), 28.9 (C-7), 29.4 (C-6), 31.9 (C-8), 32.7 (C-5), 33.1 (C-1), 36.2 (C-2), 126.5 (C-3), 134.2 (C-4) ppm.

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen gut mit denen der Literatur überein.^[495]

(E)-15-Brompentadec-7-en (140)



Zu einer Mischung aus 444 mg (18.3 mmol, 2.00 Äq.) Mg-Spänen und trockenem Et₂O (5 mL) wurde zum Aktivieren des Metalls unter Schutzgasatmosphäre ein Iodkugelchen gegeben. Das Gemisch wurde 10 min unter Rückfluss erhitzt und daraufhin im Ultraschallbad (10 min) sonografiert. Es wurde tropfenweise 1 mL einer Lösung aus 2.00 g (9.13 mmol, 1.00 Äq.) des Bromids **138** in trockenem Et₂O (5 mL) zugegeben. Um die Reaktion zu starten, wurde das Gemisch kurz erwärmt und dann bei RT mit 1,2-Dibromethan (5 Tropfen) versetzt. Danach wurde die verbliebene Bromid-Lösung tropfenweise zugegeben, sodass die Reaktionsmischung kontinuierlich schwach siedete. Nach vollständiger Zugabe des Bromids **138** wurde das Gemisch 45 min bei RT gerührt. Die entstandene graue Grignard-Lösung (**139**) wurde bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre zu einer Lösung aus 3.73 mL (27.4 mmol, 3.00 Äq.) 1,5-Dibrompentan (**154**), 2.28 mL (0.1 M in THF, 228 μ mol, 0.025 Äq.) Li₂CuCl₄-Lösung und 3.51 mL (36.5 mmol, 4.00 Äq.) NMP in trockenem THF (20 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt und daraufhin mit H₂O (100 mL) und ges. NH₄Cl-Lösung (100 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit Et₂O (4 x 50 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy) gereinigt.

Ausbeute: 853 mg (2.95 mmol, 32 %) einer farblosen Flüssigkeit.

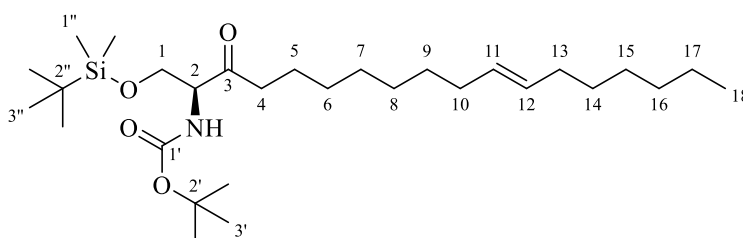
Summenformel: C₁₅H₂₉Br (289.30 g·mol⁻¹).

R_f (Cy, KMnO₄): 0.51.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.88 (t, ³J_{1,2} = 6.9 Hz, 3H, H-1), 1.26–1.46 (m, 16H, H-2–5, H-10–13), 1.81–1.89 (m, 2H, H-14), 1.94–2.03 (m, 4H, H-6, H-9), 3.40 (t, ³J_{15,14} = 6.9 Hz, 2H, H-15), 5.33–5.43 (m, 2H, H-7, H-8) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.3 (C-1), 22.8 (C-2), 28.3, 28.8, 29.0, 29.0, 29.6, 29.8 (zus. 6C, C-4–5, C-10–13), 31.9 (C-3), 32.7 (C-6 od. C-9), 32.8 (C-6 od. C-9), 33.0 (C-14), 34.2 (C-15), 130.3 (C-7 od. C-8), 130.7 (C-7 od. C-8) ppm.

***tert*-Butyl(*S,E*)-(1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-oxooctadec-11-en-2-yl)carbamat / 1-OTBS-*N*-Boc-3-Keto-(11*E*)-Sphinganin (142)**



Zu einer Mischung aus 168 mg (6.91 mmol, 10.0 Äq.) Mg-Spänen und trockenem Et₂O (5 mL) wurde zum Aktivieren des Metalls unter Schutzgasatmosphäre ein Iodkugelchen gegeben. Das Gemisch wurde 10 min unter Rückfluss erhitzt und daraufhin im Ultraschallbad (10 min) sonografiert. Es wurde tropfenweise 1 mL einer Lösung aus 1.00 g (3.46 mmol, 5.00 Äq.) des Bromids **140** in trockenem Et₂O (5 mL) zugegeben. Um die Reaktion zu starten, wurde das Gemisch kurz erwärmt und dann bei RT mit 1,2-Dibromethan (2 Tropfen) versetzt. Danach wurde die verbliebene Bromid-Lösung tropfenweise zugegeben, sodass die Reaktionsmischung kontinuierlich schwach siedete. Nach vollständiger Zugabe des Bromids **140** wurde das Gemisch 30 min bei RT gerührt. Die entstandene graue Grignard-Lösung (**141**) wurde bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre zu einer Lösung aus 251 mg (691 µmol, 1.00 Äq.) des Weinreb-Amids **37** in trockenem THF (8 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und daraufhin mit 1 M HCl (30 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (4 x 20 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:0→9:1) gereinigt.

Ausbeute: 320 mg (635 μmol , 90 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{57}\text{NO}_4\text{Si}$ (511.86 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f (Cy/EtOAc 9:1, KMnO_4): 0.54.

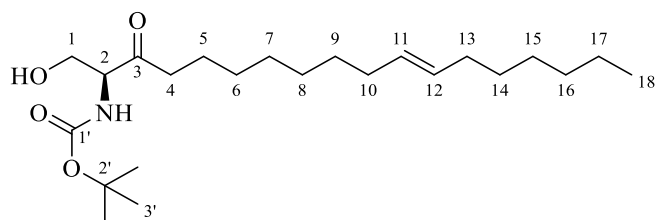
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.02$ (s, 6H, $H-1''$), 0.85 (s, 9H, $H-3''$), 0.88 (t, $^3J_{18,17} = 7.0$ Hz, 3H, $H-18$), 1.22–1.34 (m, 16H, $H-6-9$, $H-14-17$), 1.44 (s, 9H, $H-3'$), 1.54–1.60 (m, 2H, $H-5$), 1.93–1.98 (m, 4H, $H-10$, $H-13$), 2.45 (dt, $^2J_{4a,4b} = 17.3$ Hz, $^3J_{4a,5} = 7.3$ Hz, 1H, $H-4_a$), 2.57 (dt, $^2J_{4b,4a} = 17.3$ Hz, $^3J_{4b,5} = 7.5$ Hz, 1H, $H-4_b$), 3.81 (dd, $^2J_{1a,1b} = 10.4$ Hz, $^3J_{1a,2} = 4.0$ Hz, 1H, $H-1_a$), 4.04 (dd, $^2J_{1b,1a} = 10.4$ Hz, $^3J_{1b,2} = 3.0$ Hz, 1H, $H-1_b$), 4.23–4.27 (m, 1H, $H-2$), 5.32–5.42 (m, 2H, $H-11$, $H-12$), 5.48 (br d, $^3J_{\text{NH},2} = 7.3$ Hz, 1H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = -5.5$ ($C-1''$), -5.5 ($C-1''$), 14.3 ($C-18$), 18.3 ($C-2''$), 22.8 ($C-17$), 23.5 ($C-5$), 25.9 (3C, $C-3''$), 28.5 (3C, $C-3'$), 29.0, 29.1, 29.3, 29.4, 29.7, 29.7 (zus. 6C, $C-6-9$, $C-14-15$), 31.9 ($C-16$), 32.7 ($C-10$ od. $C-13$), 32.7 ($C-10$ od. $C-13$), 40.2 ($C-4$), 61.3 ($C-2$), 63.6 ($C-1$), 79.8 ($C-2'$), 130.4 ($C-11$ od. $C-12$), 130.6 ($C-11$ od. $C-12$), 155.5 ($C-1'$), 208.1 ($C-3$) ppm.

HRMS (ESI^+): m/z ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{57}\text{NNaO}_4\text{Si}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 534.39491, gef.: 534.39519 ($|\Delta m/z| = 0.54$ ppm).

***tert*-Butyl(*S,E*)-(1-hydroxy-3-oxooctadec-11-en-2-yl)carbamat /**

***N*-Boc-3-Keto-(11*E*)-Sphinganin (143)**



Zu einer Lösung aus 1.00 g (1.95 mmol, 1.00 Äq.) des Silylethers **142** in trockenem THF (10 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 2.15 mL (1 M in THF, 2.15 mmol, 1.20 Äq.) TBAF-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei RT gerührt und daraufhin mit H_2O (25 mL) und ges. NH_4Cl -Lösung (25 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 25 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl -Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck

destillativ entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 583 mg (1.47 mmol, 75 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₃H₄₃NO₄ (397.60 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 5:1, KMnO₄): 0.14.

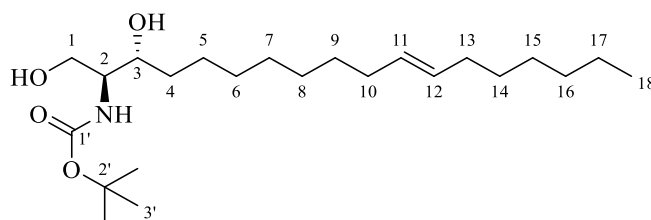
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 0.87 (t, ³J_{18,17} = 6.9 Hz, 3H, H-18), 1.26–1.31 (m, 16H, H-6–9, H-14–17), 1.44 (s, 9H, H-3'), 1.55–1.62 (m, 2H, H-5), 1.93–1.97 (m, 4H, H-10, H-13), 2.48–2.63 (m, 2H, H-4), 3.89 (dd, ²J_{1a,1b} = 11.5 Hz, ³J_{1a,2} = 3.7 Hz, 1H, H-1_a), 3.94 (dd, ²J_{1b,1a} = 11.5 Hz, ³J_{1b,2} = 3.9 Hz, 1H, H-1_b), 5.32–5.42 (m, 2H, H-11, H-12), 4.32 (app br s, 1H, H-2), 5.65 (br d, ³J_{NH,2} = 5.2 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 14.2 (C-18), 22.8 (C-17), 23.6 (C-5), 28.4 (3C, C-3'), 29.0, 29.1, 29.2, 29.4, 29.7, 29.7 (zus. 6C, C-6–9, C-14–15), 31.9 (C-16), 32.7 (C-10 od. C-13), 32.7 (C-10 od. C-13), 40.1 (C-4), 61.7 (C-2), 63.4 (C-1), 80.4 (C-2'), 130.3 (C-11 od. C-12), 130.6 (C-11 od. C-12), 156.1 (C-1'), 208.0 (C-3) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für C₂₃H₄₃NNaO₄⁺ [M+Na]⁺: 420.30898, gef.: 420.30831 (| Δ m/z| = 1.59 ppm).

tert-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-11-en-2-yl)carbamat /

N-Boc-(11*E*)-Sphinganin (133)



Zu einer Lösung aus 520 mg (1.31 mmol, 1.00 Äq.) des Ketons **143** in EtOH (40 mL) wurden bei –78 °C innerhalb von 2.5 h portionsweise 732 mg (2.88 mmol, 2.20 Äq.) LiAl(O^tBu)₃H gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4.5 h bei –78 °C gerührt und daraufhin mit 1 M HCl (30 mL) und ges. NH₄Cl-Lösung (30 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (5 x 40 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 3:1→2:1) gereinigt.

Ausbeute: 358 mg (896 μmol , 69 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NO}_4$ (399.62 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

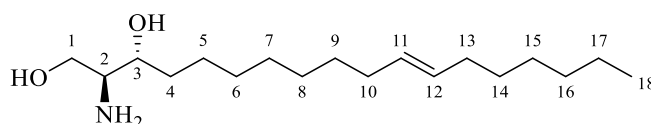
R_f (Cy/EtOAc 1:1, KMnO_4): 0.24.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 0.87$ (t, $^3J_{18,17} = 6.9$ Hz, 3H, *H*-18), 1.25–1.33 (m, 17H, *H*-5_a, *H*-6–9, *H*-14–17), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 1.50–1.56 (m, 3H, *H*-5_b, *H*-4), 1.93–1.98 (m, 4H, *H*-10, *H*-13), 2.71 (br s, 2H, 2 x OH), 3.51 (app br s, 1H, *H*-2), 3.71–3.78 (m, 2H, *H*-1_a, *H*-3), 3.97 (dd, $^2J_{1b,1a} = 11.5$ Hz, $^3J_{1b,2} = 3.5$ Hz, 1H, *H*-1_b), 5.32–5.45 (m, 3H, *H*-11, *H*-12, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 14.2$ (*C*-18), 22.8 (*C*-17), 26.1 (*C*-5), 28.5 (3*C*, *C*-3'), 29.0, 29.2, 29.6, 29.7, 29.7 (zus. 6*C*, *C*-6–9, *C*-14–15), 31.9 (*C*-16), 32.7 (*C*-10 od. *C*-13), 32.7 (*C*-10 od. *C*-13), 34.6 (*C*-4), 54.9 (*C*-2), 62.7 (*C*-1), 74.5 (*C*-3), 79.9 (*C*-2'), 130.4 (*C*-11 od. *C*-12), 130.6 (*C*-11 od. *C*-12), 156.2 (*C*-1') ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NNaO}_4^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 422.32408, gef.: 422.32393 ($|\Delta m/z| = 0.36$ ppm).

(2*S*,3*R*,*E*)-2-Amino-octadec-11-en-1,3-diol / (11*E*)-Sphinganin (126)



Zu einer Lösung aus 50.0 mg (125 μmol) des Carbamats **133** in trockenem MeOH (3 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 200 μL Acetylchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 0 °C und dann 1 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von weiteren 100 μL Acetylchlorid wurde das Gemisch 1.5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und alle flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt, das Rohprodukt in DCM (20 mL) gelöst und mit ges. NaHCO_3 -Lösung (25 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (4 x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl -Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

Ausbeute: 34.1 mg (114 μmol , 91 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_2$ (299.50 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

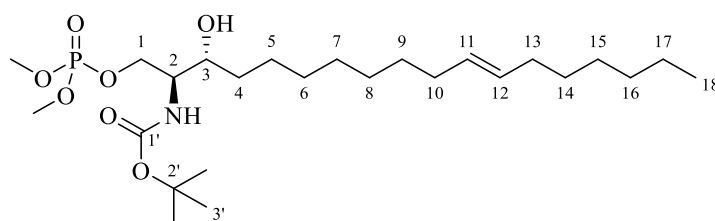
R_f (DCM/MeOH/ NEt_3 9:1:0.05, Ninhydrin): 0.22.

¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz): $\delta = 0.90$ (t, $^3J_{18,17} = 7.1$ Hz, 3H, *H*-18), 1.27–1.37 (m, 17H, *H*-5_a, *H*-6–9, *H*-14–17), 1.40–1.44 (m, 1H, *H*-4_a), 1.52–1.57 (m, 2H, *H*-5_b, *H*-4_b), 1.96–1.99 (m, 4H, *H*-10, *H*-13), 2.76 (ddd, $^3J_{2,3} = 5.1$ Hz, $^3J_{2,1a} = 7.7$ Hz, $^3J_{2,1b} = 4.2$ Hz, 1H, *H*-2), 3.49 (dd, $^2J_{1a,1b} = 10.9$ Hz, $^3J_{1a,2} = 7.7$ Hz, 1H, *H*-1_a), 3.52–3.54 (m, 1H, *H*-3), 3.74 (dd, $^2J_{1b,1a} = 10.9$ Hz, $^3J_{1b,2} = 4.2$ Hz, 1H, *H*-1_b), 5.35–5.42 (m, 2H, *H*-11, *H*-12) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz): $\delta = 14.4$ (*C*-18), 23.7 (*C*-17), 27.0 (*C*-5), 29.9, 30.2, 30.6, 30.8, 30.8, 30.8 (zus. 6C, *C*-6–9, *C*-14–15), 32.9 (*C*-16), 33.6 (2C, *C*-10, *C*-13), 34.4 (*C*-4), 58.2 (*C*-2), 63.8 (*C*-1), 73.6 (*C*-3), 131.5 (*C*-11 od. *C*-12), 131.5 (*C*-11 od. *C*-12) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₃₈NO₂⁺ [M+H]⁺: 300.28971, gef.: 300.28936 (| $\Delta m/z$ | = 1.17 ppm).

***tert*-Butyl((2*S*,3*R*,*E*)-1-((dimethoxyphosphoryl)oxy)-3-hydroxyoctadec-11-en-2-yl)carbammat / 1-OPO(OMe)₂-*N*-Boc-(11*E*)-Sphinganin (144)**



Zu einer Lösung aus 100 mg (250 μ mol, 1.00 Äq.) des Diols **133** und 104 mg (313 μ mol, 1.25 Äq.) CBr₄ in trockenem Pyridin (2 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 41.3 μ L (350 μ mol, 1.40 Äq.) P(OMe)₃ gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt und daraufhin mit 1 M HCl (10 mL) versetzt. Nach der Extraktion mit EtOAc (6 x 10 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit ges. NaHCO₃-Lösung (10 mL) und ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy/EtOAc 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 77.5 mg (153 μ mol, 61 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₅H₅₀NO₇P (507.65 g·mol⁻¹).

R_f (Cy/EtOAc 1:2, KMnO₄): 0.18.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta = 0.87$ (t, $^3J_{18,17} = 6.9$ Hz, 3H, *H*-18), 1.26–1.31 (m, 17H, *H*-5_a, *H*-6–9, *H*-14–17), 1.44 (s, 9H, *H*-3'), 1.49–1.60 (m, 3H, *H*-4, *H*-5_b), 1.93–1.98 (m, 4H,

$H-10$, $H-13$), 3.58–3.62 (m, 1H, $H-3$), 3.64–3.74 (m, 1H, $H-2$), 3.77 (d, $^3J_{\text{OMe,P}} = 3.0$ Hz, 3H, OCH_3), 3.80 (d, $^3J_{\text{OMe,P}} = 3.0$ Hz, 3H, OCH_3), 4.08–4.14 (m, 1H, $H-1_a$), 4.39–4.43 (m, 1H, $H-1_b$), 5.06 (br d, $^3J_{\text{NH}_2} = 8.6$ Hz, 1H, NH), 5.33–5.42 (m, 2H, $H-11$, $H-12$) ppm.

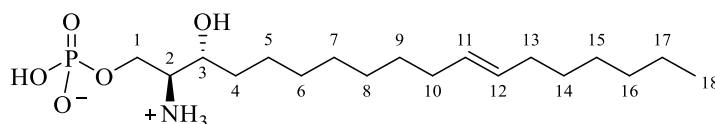
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): $\delta = 14.2$ ($C-18$), 22.8 ($C-17$), 26.0 ($C-5$), 28.5 (3C, $C-3'$), 29.0, 29.2, 29.6, 29.7, 29.7, 29.8 (zus. 6C, $C-6-9$, $C-14-15$), 31.9 ($C-16$), 32.7 ($C-10$ od. $C-13$), 32.7 ($C-10$ od. $C-13$), 33.9 ($C-4$), 54.8 (d, $^2J_{\text{OMe,P}} = 6.0$ Hz, 2C, 2 x OCH_3), 55.0 (d, $^3J_{2,\text{P}} = 6.0$ Hz, $C-2$), 67.1 (d, $^2J_{1,\text{P}} = 5.7$ Hz, $C-1$), 71.4 ($C-3$), 79.9 ($C-2'$), 130.4 ($C-11$ od. $C-12$), 130.5 ($C-11$ od. $C-12$), 155.8 ($C-1'$) ppm.

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 160 MHz): $\delta = 5.17$ (s) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 160 MHz): $\delta = 4.99-5.36$ (m) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{NNaO}_7\text{P}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 530.32171, gef.: 530.32342 ($|\Delta m/z| = 3.23$ ppm).

(2*S*,3*R*,*E*)-2-Ammonio-3-hydroxyoctadec-11-en-1-ylhydrogenphosphat / (11*E*)-S1P (127)



Zu einer Lösung aus 40.0 mg (78.8 μmol , 1.00 $\text{\AA}q.$) des Phosphatesters **144** in trockenem DCM (3 mL) wurden bei 0 °C unter Schutzgasatmosphäre 80.0 μL (630 μmol , 8.00 $\text{\AA}q.$) TMSBr gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel und alle flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt und der Rückstand in MeOH/ H_2O (19:1, 3 mL) gelöst. Die Mischung wurde 1 h bei RT gerührt und die Lösungsmittel daraufhin unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde mit MeOH (1 mL) im Ultraschallbad (5 min) gewaschen, danach abzentrifugiert (12000 rpm, 5 min) und unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute: 15.7 mg (41.3 μmol , 52 %) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_5\text{P}$ (379.48 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 70:26:4, KMnO_4): 0.16.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz): $\delta = 0.90$ (t, $^3J_{18,17} = 7.0$ Hz, 3H, $H-18$), 1.29–1.38 (m, 17H, $H-5_a$, $H-6-9$, $H-14-17$), 1.46–1.55 (m, 3H, $H-5_b$, $H-4$), 1.93–1.98 (m, 4H, $H-10$, $H-13$),

3.30–3.32 (m, 1H, *H*-2, Überlagerung mit Restprotonensignal von CD₃OD), 3.74–3.77 (m, 1H, *H*-3), 4.00–4.04 (m, 1H, *H*-1_a), 4.09–4.12 (m, 1H, *H*-1_b), 5.35–5.42 (m, 2H, *H*-11, *H*-12) ppm.

¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ = 14.4 (*C*-18), 23.7 (*C*-17), 27.0 (*C*-5), 29.9, 30.2, 30.6, 30.8, 30.8 (zus. 6C, *C*-6–9, *C*-14–15), 32.9 (*C*-16), 33.6 (2C, *C*-10, *C*-13), 34.0 (*C*-4), 57.6 (d, ³*J*_{2,P} = 6.0 Hz, *C*-2), 62.6 (d, ²*J*_{1,P} = 4.4 Hz, *C*-1), 70.1 (*C*-3), 131.5 (*C*-11 od. *C*-12), 131.5 (*C*-11 od. *C*-12) ppm.

³¹P{¹H}-NMR (CD₃OD, 160 MHz): δ = 4.47 (s) ppm.

³¹P-NMR (CD₃OD, 160 MHz): δ = 4.47 (dd, ³*J*_{P,1a} = 7.4 Hz, ³*J*_{P,1b} = 7.4 Hz) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* ber. für C₁₈H₃₈NNaO₅P⁺ [M+Na]⁺: 402.23798, gef.: 402.23751 (| $\Delta m/z$ | = 1.17 ppm).

8 Literaturverzeichnis

- [1] P. Ehrlich, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1954**, *5*, 67–86.
- [2] P. Mazzarello, *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, E13–E15.
- [3] F. Winau, O. Westphal, R. Winau, *Microb. Infect.* **2004**, *6*, 786–789.
- [4] N. de Jonge, D. B. Peckys, *ACS Nano* **2016**, *10*, 9061–9063.
- [5] S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8054–8066.
- [6] K. Im, S. Mareninov, M. F. P. Diaz, W. H. Yong, *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1897*, 299–311.
- [7] J. Schlegel, S. Peters, S. Doose, A. Schubert-Unkmeir, M. Sauer, *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 194.
- [8] Y. Zhang, L. K. Schroeder, M. D. Lessard, P. Kidd, J. Chung, Y. Song, L. Benedetti, Y. Li, J. Ries, J. B. Grimm, L. D. Lavis, P. De Camilli, J. E. Rothman, D. Baddeley, J. Bewersdorf, *Nat. Methods* **2020**, *17*, 225–231.
- [9] M. S. T. Gonçalves, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190–212.
- [10] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579–2619.
- [11] M. Zheng, L. Zheng, P. Zhang, J. Li, Y. Zhang, *Molecules* **2015**, *20*, 3190–3205.
- [12] A. Borrmann, J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2123–2134.
- [13] Craig S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1075–1101.
- [14] L. Schermelleh, A. Ferrand, T. Huser, C. Eggeling, M. Sauer, O. Biehlmaier, G. P. C. Drummen, *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 72–84.
- [15] T. A. Klar, S. W. Hell, *Opt. Lett.* **1999**, *24*, 954–956.
- [16] E. Abbe, *Archiv f. mikrosk. Anatomie* **1873**, *9*, 413–468.
- [17] C. Cremer, *Phys. unserer Zeit* **2011**, *42*, 21–29.
- [18] J. Fink, J. Seibel, *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 1157–1168.
- [19] E. Izquierdo, A. Delgado, *Chem. Phys. Lipids* **2018**, *215*, 71–83.
- [20] J. Bielawski, J. S. Pierce, J. Snider, B. Rembiesa, Z. M. Szulc, A. Bielawska, *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules* (Eds.: C. Chalfant, M. D. Poeta), Springer New York, New York, **2010**, 46–59.
- [21] X. Han, *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 668–679.
- [22] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 175–191.
- [23] R. Pralhada Rao, N. Vaidyanathan, M. Rengasamy, A. Mammen Oommen, N. Somaiya, M. R. Jagannath, *J. Lipids* **2013**, *2013*, 178910.
- [24] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- [25] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Sci. China Chem.* **2010**, *53*, 61–70.
- [26] S. S. Nguyen, J. A. Prescher, *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4*, 476–489.
- [27] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [28] I. Nikić, T. Plass, O. Schraidt, J. Szymański, J. A. G. Briggs, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2245–2249.
- [29] P. C. Trippier, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 190–203.
- [30] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
- [31] R. J. Griffin, *Prog. Med. Chem.* (Eds.: G. P. Ellis, D. K. Luscombe), Elsevier, **1994**, *31*, 121–232.
- [32] K. Lang, J. W. Chin, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764–4806.
- [33] S. T. Laughlin, N. J. Agard, J. M. Baskin, I. S. Carrico, P. V. Chang, A. S. Ganguli, M. J. Hangauer, A. Lo, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 230–250.
- [34] M. Garrido, J. L. Abad, G. Fabriàs, J. Casas, A. Delgado, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 641–650.
- [35] M. F. Debets, C. W. J. van der Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168–1184.
- [36] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [37] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [38] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 19–24.
- [39] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873–877.

- [40] D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E.-J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 9116–9121.
- [41] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
- [42] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941.
- [43] C. Bednarek, I. Wehl, N. Jung, U. Schepers, S. Bräse, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 4301–4354.
- [44] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. van Hest, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806–8827.
- [45] K. Lang, J. W. Chin, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 16–20.
- [46] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [47] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249–1262.
- [48] M. D. Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571–6584.
- [49] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950.
- [50] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 633–645.
- [51] R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357–396.
- [52] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [53] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [54] S. Neumann, M. Biewend, S. Rana, W. H. Binder, *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41*, 1900359.
- [55] L. Zhu, C. J. Brassard, X. Zhang, P. M. Guha, R. J. Clark, *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 1501–1517.
- [56] M. Meldal, F. Diness, *Trends Chem.* **2020**, *2*, 569–584.
- [57] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–460.
- [58] L. Li, Z. Zhang, *Molecules* **2016**, *21*, 1393.
- [59] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconj. Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.
- [60] C. Besanceney-Webler, H. Jiang, T. Zheng, L. Feng, D. Soriano del Amo, W. Wang, L. M. Klivansky, F. L. Marlow, Y. Liu, P. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051–8056.
- [61] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [62] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Cycloadditions in Bioorthogonal Chemistry* (Eds.: M. Vrabel, T. Carell), Springer International Publishing, Cham, **2016**, 57–76.
- [63] A. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153–2154.
- [64] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.
- [65] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
- [66] C. P. Ramil, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007–11022.
- [67] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486–11493.
- [68] D. H. Ess, G. O. Jones, K. N. Houk, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1633–1636.
- [69] R. G. Plevy, J. C. Tatlow, *Sci. Prog.* **1970**, *58*, 481–506.
- [70] P. Shah, A. D. Westwell, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 527–540.
- [71] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255.
- [72] J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.
- [73] M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99.
- [74] A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, *Bioconj. Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.
- [75] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690.
- [76] E. Kim, H. Koo, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 7835–7851.
- [77] J. Sauer, D. K. Heldmann, J. Hetzenegger, J. Krauthan, H. Sichert, J. Schuster, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 2885–2896.
- [78] F. Liu, R. S. Paton, S. Kim, Y. Liang, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15642–15649.
- [79] F. Liu, Y. Liang, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11483–11493.
- [80] A. Darko, S. Wallace, O. Dmitrenko, M. M. Machovina, R. A. Mehl, J. W. Chin, J. M. Fox, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3770–3776.
- [81] J. Li, S. Jia, P. R. Chen, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1003–1005.
- [82] J.-E. Hoffmann, T. Plass, I. Nikić, I. V. Aramburu, C. Koehler, H. Gillandt, E. A. Lemke, C. Schultz, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 12266–12270.
- [83] A. Meijer, S. Otto, J. B. F. N. Engberts, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8989–8994.

- [84] M. Royzen, N. Yee, J. M. Mejia Oneto, *Handbook of In Vivo Chemistry in Mice: From Lab to Living System* (Eds.: K. Tanaka, K. Vong), John Wiley & Sons, Hoboken, **2020**, 249–279.
- [85] R. S. Erdmann, H. Takakura, A. D. Thompson, F. Rivera-Molina, E. S. Allgeyer, J. Bewersdorf, D. Toomre, A. Schepartz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10242–10246.
- [86] J. L. W. Thudichum, *A treatise on the chemical constitution of the brain*, Bailliere, Tindall, Cox, London, **1884**.
- [87] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 139–150.
- [88] P. Sperling, E. Heinz, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1632*, 1–15.
- [89] I. Olsen, E. Jantzen, *Anaerobe* **2001**, *7*, 103–112.
- [90] Y. Hirabayashi, Y. Igarashi, A. H. Merrill, *Sphingolipid Biology* (Eds.: Y. Hirabayashi, Y. Igarashi, A. H. Merrill), Springer Japan, Tokyo, **2006**, 3–22.
- [91] K. Zhou, T. Blom, *Lipid Insights* **2015**, *8*, 11–20.
- [92] S. T. Pruett, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C. A. Haynes, M. C. Sullards, D. C. Liotta, A. H. Merrill, Jr., *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1621–1639.
- [93] M. V. Airola, Y. A. Hannun, *Sphingolipids: Basic Science and Drug Development* (Eds.: E. Gulbins, I. Petrache), Springer-Verlag Wien, Wien, **2013**, 57–76.
- [94] O. Renkonen, E. L. Hirvisalo, *J. Lipid Res.* **1969**, *10*, 687–693.
- [95] H. Farwanah, B. Pierstorff, C. E. Schmelzer, K. Raith, R. H. Neubert, T. Kolter, K. Sandhoff, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *852*, 562–570.
- [96] M. E. Stewart, D. T. Downing, *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *105*, 613–618.
- [97] W. R. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *316*, 98–107.
- [98] A. H. Merrill, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6387–6422.
- [99] O. Quehenberger, A. M. Armando, A. H. Brown, S. B. Milne, D. S. Myers, A. H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K. N. Jones, S. Kelly, R. L. Shaner, C. M. Sullards, E. Wang, R. C. Murphy, R. M. Barkley, T. J. Leiker, C. R. H. Raetz, Z. Guan, G. M. Laird, D. A. Six, D. W. Russell, J. G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy, E. A. Dennis, *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 3299–3305.
- [100] B. Breiden, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 441–452.
- [101] D. J. Moore, A. V. Rawlings, *Int. J. Cosmetic Sci.* **2017**, *39*, 366–372.
- [102] Y. Masukawa, H. Narita, E. Shimizu, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, T. Kitahara, Y. Takema, K. Kita, *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1466–1476.
- [103] S. H. Lee, S. K. Jeong, S. K. Ahn, *Yonsei Med. J.* **2006**, *47*, 293–306.
- [104] H. Van Overloop, Y. Denizot, M. Baes, P. P. Van Veldhoven, *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 315–324.
- [105] P. J. Slotte, *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 206–219.
- [106] G. C. P. Kikas, D. Tziakas, *Eur. Cardiol. Rev.* **2018**, *13*, 42–45.
- [107] R. L. Schnaar, T. Kinoshita, *Essentials of Glycobiology* (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger), Cold Spring Harbor, New York, **2015**, 125–135.
- [108] G. D'Angelo, S. Capasso, L. Sticco, D. Russo, *FEBS J.* **2013**, *280*, 6338–6353.
- [109] D. Wigger, E. Gulbins, B. Kleuser, F. Schumacher, *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 210.
- [110] C. R. Gault, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules* (Eds.: C. Chalfant, M. D. Poeta), Springer New York, New York, **2010**, 1–23.
- [111] P. J. Harrison, Teresa M. Dunn, D. J. Campopiano, *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 921–954.
- [112] A. H. Merrill, Jr., R. D. Williams, *J. Lipid Res.* **1984**, *25*, 185–188.
- [113] C. A. Haynes, J. C. Allegood, K. Sims, E. W. Wang, M. C. Sullards, A. H. Merrill, Jr., *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1113–1125.
- [114] A. Penno, M. M. Reilly, H. Houlden, M. Laurá, K. Rentsch, V. Niederkofler, E. T. Stoeckli, G. Nicholson, F. Eichler, R. H. Brown, A. von Eckardstein, T. Hornemann, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11178–11187.
- [115] S. C. Linn, H. S. Kim, E. M. Keane, L. M. Andras, E. Wang, A. H. Merrill, Jr, *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 831–835.
- [116] W. Stoffel, *Chem. Phys. Lipids* **1970**, *5*, 139–158.
- [117] M. Levy, A. H. Futerman, *IUBMB Life* **2010**, *62*, 347–356.
- [118] C. R. Gault, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *688*, 1–23.
- [119] S. Merscher, A. Fornoni, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2014**, *5*, 127.
- [120] N. Bartke, Y. A. Hannun, *J. Lipid Res.* **2009**, *50 Suppl*, 91–96.
- [121] S. Lahiri, A. H. Futerman, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2270–2284.

- [122] T. Yamaji, K. Kumagai, N. Tomishige, K. Hanada, *IUBMB Life* **2008**, *60*, 511–518.
- [123] K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, M. Nishijima, *Nature* **2003**, *426*, 803–809.
- [124] K. Kumagai, S. Yasuda, K. Okemoto, M. Nishijima, S. Kobayashi, K. Hanada, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6488–6495.
- [125] F. G. Tafesse, P. Ternes, J. C. M. Holthuis, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29421–29425.
- [126] C. Pavoine, F. Pecker, *Cardiovasc. Res.* **2009**, *82*, 175–183.
- [127] T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, R. G. Boot, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, J. M. F. G. Aerts, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8848–8869.
- [128] M. C. Messner, M. C. Cabot, *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules* (Eds.: C. Chalfant, M. D. Poeta), Springer New York, New York, **2010**, 156–164.
- [129] S. Ichikawa, Y. Hirabayashi, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 198–202.
- [130] S.-i. Hakomori, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 325–346.
- [131] S.-i. Hakomori, *Sci. Am.* **1986**, *254*, 44–53.
- [132] G. Tettamanti, *Glycoconj. J.* **2004**, *20*, 301–317.
- [133] D. S. Wijesinghe, A. Massiello, P. Subramanian, Z. Szulc, A. Bielawska, C. E. Chalfant, *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 2706–2716.
- [134] A. Boath, C. Graf, E. Lidome, T. Ullrich, P. Nussbaumer, F. Bornancin, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8517–8526.
- [135] A. Gómez-Muñoz, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 2049–2056.
- [136] C. Mao, L. M. Obeid, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1781*, 424–434.
- [137] K. Kitatani, J. Idkowiak-Baldys, Y. A. Hannun, *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 1010–1018.
- [138] N. C. Hait, C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 2016–2026.
- [139] K. R. Johnson, K. Y. Johnson, K. P. Becker, J. Bielawski, C. Mao, L. M. Obeid, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34541–34547.
- [140] P. Bandhuvula, J. D. Saba, *Trends Mol. Med.* **2007**, *13*, 210–217.
- [141] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532–1568.
- [142] M. J. Pulkoski-Gross, J. C. Donaldson, L. M. Obeid, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *50*, 298–313.
- [143] M. Maceyka, S. Spiegel, *Nature* **2014**, *510*, 58–67.
- [144] T. Kolter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 2057–2079.
- [145] H. Schulze, K. Sandhoff, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a004804.
- [146] C. Arenz, *Future Med. Chem.* **2017**, *9*, 1687–1700.
- [147] J. Stirnemann, N. Belmatoug, F. Camou, C. Serratrice, R. Froissart, C. Caillaud, T. Levade, L. Astudillo, J. Serratrice, A. Brassier, C. Rose, T. Billette de Villemeur, M. G. Berger, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 441.
- [148] E. H. Schuchman, M. P. Wasserstein, *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *29*, 237–247.
- [149] F. P. S. Yu, S. Amintas, T. Levade, J. A. Medin, *Orphanet J. Rare Dis.* **2018**, *13*, 121.
- [150] C. Yu, *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism* (Eds.: U. Garg, L. D. Smith), Elsevier, San Diego, **2017**, 211–233.
- [151] M. S. Sands, *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 799–801.
- [152] Y. A. Hannun, C. R. Loomis, A. H. Merrill, Jr., R. M. Bell, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12604–12609.
- [153] Y. A. Hannun, R. M. Bell, *Clin. Chim. Acta* **1989**, *185*, 333–345.
- [154] R. N. Kolesnick, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 16759–16762.
- [155] A. H. Futerman, *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)* (Eds.: N. D. Ridgway, R. S. McLeod), Elsevier, Boston, **2016**, 297–326.
- [156] H. Zhang, N. N. Desai, A. Olivera, T. Seki, G. Brooker, S. Spiegel, *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 155–167.
- [157] Y. Zhang, X. Li, K. A. Becker, E. Gulbins, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 178–183.
- [158] H. Grassme, A. Jekle, A. Riehle, H. Schwarz, J. Berger, K. Sandhoff, R. Kolesnick, E. Gulbins, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20589–20596.
- [159] H. Grassmé, J. Riethmüller, E. Gulbins, *Prog. Lipid Res.* **2007**, *46*, 161–170.
- [160] Y. Igarashi, *J. Biochem.* **1997**, *122*, 1080–1087.

- [161] J. Woodcock, *IUBMB Life* **2006**, *58*, 462–466.
- [162] T. Hla, *Semin. Cell Dev. Biol.*, Elsevier, **2004**, *15*, 513–520.
- [163] K. Mendelson, T. Evans, T. Hla, *Development* **2014**, *141*, 5–9.
- [164] S. Pyne, N. J. Pyne, *Biochem. J.* **2000**, *349*, 385–402.
- [165] J. Newton, S. Lima, M. Maceyka, S. Spiegel, *Exp. Cell Res.* **2015**, *333*, 195.
- [166] O. Cu villier, G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, J. S. Gutkind, S. Spiegel, *Nature* **1996**, *381*, 800–803.
- [167] S. M. Mandala, R. Thornton, Z. Tu, M. B. Kurtz, J. Nickels, J. Broach, R. Menzeleev, S. Spiegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 150–155.
- [168] B. Ogretmen, *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 33–50.
- [169] A. J. Melendez, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 66–75.
- [170] M. Sanford, *Drugs* **2014**, *74*, 1411–1433.
- [171] J. Ingwersen, O. Aktas, P. Kuery, B. Kieseier, A. Boyko, H.-P. Hartung, *Clin. Immunol.* **2012**, *142*, 15–24.
- [172] V. Brinkmann, M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C. A. Foster, M. Zollinger, K. R. Lynch, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21453–21457.
- [173] V. Brinkmann, J. G. Cyster, T. Hla, *Am. J. Transplant.* **2004**, *4*, 1019–1025.
- [174] J. E. Baker, R. M. Boudreau, A. P. Seitz, C. C. Caldwell, E. Gulbins, M. J. Edwards, *Surg. Infect. (Larchmt.)* **2018**, *19*, 792–803.
- [175] T. C. Kunz, V. Kozjak-Pavlovic, *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 203.
- [176] R. J. Dubos, *J. Exp. Med.* **1948**, *88*, 73–79.
- [177] S. K. Garg, E. Volpe, G. Palmieri, M. Mattei, D. Galati, A. Martino, M. S. Piccioni, E. Valente, E. Bonanno, P. De Vito, P. M. Baldini, L. G. Spagnoli, V. Colizzi, M. Fraziano, *J. Infect. Dis.* **2004**, *189*, 2129–2138.
- [178] C. L. Fischer, D. R. Blanchette, K. A. Brogden, D. V. Dawson, D. R. Drake, J. R. Hill, P. W. Wertz, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 319–322.
- [179] D. R. Drake, K. A. Brogden, D. V. Dawson, P. W. Wertz, *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 4–11.
- [180] D. J. Bibel, R. Aly, H. R. Shinefield, *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *98*, 269–273.
- [181] C. L. Fischer, D. R. Drake, D. V. Dawson, D. R. Blanchette, K. A. Brogden, P. W. Wertz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1157–1161.
- [182] C. L. Fischer, K. S. Walters, D. R. Drake, D. R. Blanchette, D. V. Dawson, K. A. Brogden, P. W. Wertz, *Skin Pharmacol. Physiol.* **2013**, *26*, 36–44.
- [183] Y. Pewzner-Jung, S. Tavakoli Tabazavareh, H. Grassmé, K. A. Becker, L. Japtok, J. Steinmann, T. Joseph, S. Lang, B. Tuemmler, E. H. Schuchman, A. B. Lentsch, B. Kleuser, M. J. Edwards, A. H. Futerman, E. Gulbins, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 1205–1214.
- [184] G. E. Martin, R. M. Boudreau, C. Couch, K. A. Becker, M. J. Edwards, C. C. Caldwell, E. Gulbins, A. Seitz, *Biochimie* **2017**, *141*, 91–96.
- [185] H. Carstens, F. Schumacher, S. Keitsch, M. Kramer, C. Kühn, C. Sehl, M. Soddemann, B. Wilker, D. Herrmann, A. Swaidan, *Cell. Physiol. Biochem* **2019**, *53*, 1015–1028.
- [186] T. Vijai Kumar Reddy, A. Jyotsna, B. L. A. Prabhavathi Devi, R. B. N. Prasad, Y. Poornachandra, C. Ganesh Kumar, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *118*, 98–106.
- [187] E. del Olmo, G. M. Molina-Salinas, R. Escarcena, M. Alves, J. L. López-Pérez, R. Hernandez-Pando, S. Said-Fernández, A. S. Feliciano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5764–5768.
- [188] E. M. Saied, S. Banhart, S. E. Bürkle, D. Heuer, C. Arenz, *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 1971–1980.
- [189] J. Becam, T. Walter, A. Burgert, J. Schlegel, M. Sauer, J. Seibel, A. Schubert-Unkmeir, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17627.
- [190] T. Walter, *Bioorthogonal funktionalisierte Sphingolipide zur Evaluierung von Lipiddynamiken in vivo.*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2018**.
- [191] R. Verhaegh, K. A. Becker, M. J. Edwards, E. Gulbins, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 7686–7696.
- [192] K. Miazek, S. Lebecque, M. Hamaidia, A. Paul, S. Danthine, L. Willems, M. Frédéric, E. D. Pauw, M. Deleu, A. Richel, D. Goffin, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2016**, *20*, 321–336.
- [193] U. H. Do, S. Ramachandran, *J. Lipid Res.* **1980**, *21*, 888–894.
- [194] J. B. Massey, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1510*, 167–184.

- [195] M. J. Gerl, V. Bittl, S. Kirchner, T. Sachsenheimer, H. L. Brunner, C. Lüchtenborg, C. Özbalci, H. Wiedemann, S. Wegehingel, W. Nickel, P. Haberkant, C. Schultz, M. Krüger, B. Brügger, *PLoS One* **2016**, *11*, e0153009.
- [196] S. G. B. Gowda, S. Usuki, M. A. S. Hammam, Y. Murai, Y. Igarashi, K. Monde, *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 325–331.
- [197] R. Bittman, C. A. Verbicky, *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 2089–2093.
- [198] H. Hidaka, M. Takiwaki, M. Yamashita, S. Otsuki, K. Kawasaki, M. Sugano, T. Honda, *J. Anal. Bio-Sci.* **2012**, *35*, 241–248.
- [199] H. Van Overloop, G. Van der Hoeven, P. P. Van Veldhoven, *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 812–816.
- [200] T. Taketomi, N. Kawamura, *J. Biochem.* **1972**, *72*, 189–193.
- [201] Y. Gao, X. He, F. Ding, Y. Zhang, *Synthesis* **2016**, *48*, 4017–4037.
- [202] D. Shapiro, K. Segal, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5894–5895.
- [203] R. I. Duclos, *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *111*, 111–138.
- [204] M. Kiso, A. Nakamura, J. Nakamura, Y. Tomita, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1986**, *5*, 335–340.
- [205] V. D. Chaudhari, K. S. Ajish Kumar, D. D. Dhavale, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5805–5807.
- [206] M. Obayashi, M. Schlosser, *Chem. Lett.* **1985**, *14*, 1715–1718.
- [207] P. Zimmermann, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, *1988*, 663–667.
- [208] Y.-L. Li, Y.-L. Wu, *Liebigs Annalen* **1996**, *1996*, 2079–2082.
- [209] T. Tashiro, K. Mori, *Stud. Nat. Prod. Chem.* (Ed.: R. Atta-ur), Elsevier, **2014**, *42*, 1–31.
- [210] K. V. Sajna, L. D. Gottumukkala, R. K. Sukumaran, A. Pandey, *Industrial Biorefineries & White Biotechnology* (Eds.: A. Pandey, R. Höfer, M. Taherzadeh, K. M. Nampoothiri, C. Larroche), Elsevier, Amsterdam, **2015**, 607–652.
- [211] R. J. B. H. N. van den Berg, H. van den Elst, C. G. N. Korevaar, J. M. F. G. Aerts, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 6685–6689.
- [212] R. J. B. H. N. van den Berg, C. G. N. Korevaar, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8409–8412.
- [213] R. J. B. H. N. van den Berg, C. G. N. Korevaar, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5699–5704.
- [214] S. Kim, S. Lee, T. Lee, H. Ko, D. Kim, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8661–8664.
- [215] Y. M. Lee, S. Lee, H. Jeon, D. J. Baek, J. H. Seo, D. Kim, S. Kim, *Synthesis* **2011**, *2011*, 867–872.
- [216] A. Sankar, I. C. Chen, S.-Y. Luo, *Carbohydr. Res.* **2018**, *463*, 1–5.
- [217] P. Merino, P. Jimenez, T. Tejero, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4685–4688.
- [218] J. A. Morales-Serna, J. Llaveria, Y. Díaz, M. I. Matheu, S. Castellón, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4502–4504.
- [219] F. Sarabia, C. Vivar-García, M. García-Castro, C. García-Ruiz, F. Martín-Gálvez, A. Sánchez-Ruiz, S. Chammaa, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15190–15201.
- [220] W. Disadee, T. Ishikawa, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9399–9406.
- [221] L. He, H.-S. Byun, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7627–7633.
- [222] S. Torssell, P. Somfai, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1643–1646.
- [223] J. Hoecker, G. C. Rudolf, F. Bächle, S. Fleischer, B. D. Lindner, G. Helmchen, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 5149–5159.
- [224] P. Garner, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5855–5858.
- [225] P. Garner, J. M. Park, E. Malecki, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4395–4398.
- [226] M. Passiniemi, A. M. P. Koskinen, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2641–2659.
- [227] P. Herold, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 354–362.
- [228] N. T. Anh, *Organic Chemistry Syntheses and Reactivity*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1980**, *88*, 145–162.
- [229] R. A. Benkeser, G. Schroll, D. M. Sauve, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3378–3379.
- [230] A. Rathi, *Synlett* **2010**, *2010*, 1140–1141.
- [231] H. Lindlar, *Helv. Chim. Acta* **1952**, *35*, 446–450.
- [232] T. Murakami, K. Furusawa, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9257–9263.
- [233] Z. Ferjančić, R. Matović, F. Bihelović, *J. Serb. Chem. Soc.* **2014**, *79*, 627–636.
- [234] K. P. Bhabak, D. Proksch, S. Redmer, C. Arenz, *Biorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6154–6161.
- [235] K. Sa-Ei, J. Montgomery, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6707–6711.

- [236] J.-M. Lee, H.-S. Lim, S.-K. Chung, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 343–347.
- [237] M. A. Blanchette, W. Choy, J. T. Davis, A. P. Essendorf, S. Masamune, W. R. Roush, T. Sakai, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2183–2186.
- [238] J. Chun, G. Li, H.-S. Byun, R. Bittman, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 375–377.
- [239] J. A. Morales-Serna, A. Sauza, G. Padrón de Jesús, R. Gaviño, G. García de la Mora, J. Cárdenas, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 7111–7114.
- [240] H. Yang, L. S. Liebeskind, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2993–2995.
- [241] T. Yamamoto, H. Hasegawa, T. Hakogi, S. Katsumura, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5569–5572.
- [242] C. Peters, A. Billich, M. Ghobrial, K. Högenauer, T. Ullrich, P. Nussbaumer, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1842–1845.
- [243] R. Kim, K. Lou, M. L. Kraft, *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 265–275.
- [244] P. Bandhuvula, Z. Li, R. Bittman, J. D. Saba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *380*, 366–370.
- [245] N. Lipsky, R. Pagano, *Science* **1985**, *228*, 745–747.
- [246] G. Schwarzmann, C. Arenz, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 1161–1173.
- [247] O. Maier, V. Oberle, D. Hoekstra, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116*, 3–18.
- [248] R. Pagano, R. Sleight, *Science* **1985**, *229*, 1051–1057.
- [249] N. G. Lipsky, R. E. Pagano, *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 27–34.
- [250] K. Simons, G. Van Meer, *Biochemistry* **1988**, *27*, 6197–6202.
- [251] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [252] G. van Meer, R. M. J. Liskamp, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 14–15.
- [253] R. E. Pagano, M. A. Sepanski, O. C. Martin, *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 2067–2079.
- [254] X.-M. Chen, Q. Cao, H. K. Bisoyi, M. Wang, H. Yang, Q. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 10493–10497.
- [255] D. Talamás-Lara, K. Acosta-Virgen, B. Chávez-Munguía, A. Lagunes-Guillén, L. Salazar-Villatoro, M. Espinosa-Cantellano, A. Martínez-Palomo, *Microsc. Res. Tech.* **2021**, *84*, 1887–1896.
- [256] B. Gurram, M. Li, J. Fan, J. Wang, X. Peng, *Front. Chem. Sci. Eng.* **2020**, *14*, 41–52.
- [257] H. Van Overloop, G. Van der Hoeven, P. P. Van Veldhoven, *J. Lipids* **2012**, *2012*, 404513–404513.
- [258] M. Park, V. Kaddai, J. Ching, K. T. Fridianto, R. J. Sieli, S. Sugii, S. A. Summers, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 23978–23988.
- [259] P. Paul, Y. Kamisaka, D. L. Marks, R. E. Pagano, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2287–2293.
- [260] R. E. Pagano, O. C. Martin, H. C. Kang, R. P. Haugland, *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 1267–1279.
- [261] D. L. Marks, R. Bittman, R. E. Pagano, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130*, 819–832.
- [262] R. D. Kaiser, E. London, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1375*, 13–22.
- [263] N. Thieblemont, S. D. Wright, *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 523–534.
- [264] M. Imoto, I. Tachibana, R. Urrutia, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 1341–1349.
- [265] K. Laulagnier, H. Vincent-Schneider, S. Hamdi, C. Subra, D. Lankar, M. Record, *Blood Cells Mol. Dis.* **2005**, *35*, 116–121.
- [266] J. Bai, R. E. Pagano, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8840–8848.
- [267] S. Koch-Edelmann, S. Banhart, E. M. Saied, L. Rose, L. Aeberhard, M. Laue, J. Doellinger, C. Arenz, D. Heuer, *Cell. Microbiol.* **2017**, *19*, e12752.
- [268] P. Ettmayer, A. Billich, T. Baumruker, D. Mechtcheriakova, H. Schmid, P. Nussbaumer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1555–1558.
- [269] T. Pinkert, D. Furkert, T. Korte, A. Herrmann, C. Arenz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2790–2794.
- [270] H. Sahoo, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2011**, *12*, 20–30.
- [271] Z. H. Mohamed, C. Rhein, E. M. Saied, J. Kornhuber, C. Arenz, *Chem. Phys. Lipids* **2018**, *216*, 152–161.
- [272] T.-Y. Wang, J. R. Silvius, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1478–1489.
- [273] T. Makiyama, H. Nakamura, N. Nagasaka, H. Yamashita, T. Honda, N. Yamaguchi, A. Nishida, T. Murayama, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **2015**, *16*, 476–492.
- [274] L. Collenburg, T. Walter, A. Burgert, N. Müller, J. Seibel, L. Japtok, B. Kleuser, M. Sauer, S. Schneider-Schaulies, *J. Immunol.* **2016**, *196*, 3951–3962.
- [275] P. Antes, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, *Eur. J. Cell Biol.* **1992**, *59*, 27–36.

- [276] L. Kuerschner, C. S. Ejsing, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. I. Anderson, C. Thiele, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 39–45.
- [277] I. Nieves, J.-L. Abad, L. R. Montes, F. M. Goñi, A. Delgado, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 605–612.
- [278] L. Kuerschner, C. Thiele, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 1031–1037.
- [279] L. J. Patalag, J. Sibold, O. M. Schütte, C. Steinem, D. B. Werz, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2171–2178.
- [280] J. Fink, J. Seibel, *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 1157–1168.
- [281] T. Walter, J. Schlegel, A. Burgert, A. Kurz, J. Seibel, M. Sauer, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6836–6839.
- [282] J. Fink, *Synthese und Charakterisierung von Azid-funktionalisierten Sphingosinderivaten*, Masterarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2017**.
- [283] C. Sternstein, *Synthese von Phospho- und Sphingolipiden zur Entwicklung antibakterieller Wirkstoffe*, Masterarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2018**.
- [284] A. Gaebler, R. Milan, L. Straub, D. Hoelper, L. Kuerschner, C. Thiele, *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 2282–2290.
- [285] E. J. Corey, J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2647–2650.
- [286] S. Müller, B. Liepold, G. J. Roth, H. J. Bestmann, *Synlett* **1996**, *1996*, 521–522.
- [287] A. Gaebler, R. Milan, L. Straub, D. Hoelper, L. Kuerschner, C. Thiele, *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 2282–2290.
- [288] A. Gaebler, A. Penno, L. Kuerschner, C. Thiele, *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 1934–1947.
- [289] M.-T. Lee, H. H. Le, E. L. Johnson, *J. Lipid Res.* **2021**, *62*, 100034.
- [290] J. Schulte-Zweckel, T. Schneidewind, J. L. Abad, A. Brockmeyer, P. Janning, G. Triola, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13742–13745.
- [291] A. L. Mackinnon, J. Taunton, *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2009**, *1*, 55–73.
- [292] P. Haberkant, J. C. M. Holthuis, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 1022–1030.
- [293] P. Haberkant, F. Stein, D. Höglinger, M. J. Gerl, B. Brügger, P. P. Van Veldhoven, J. Krijgsveld, A.-C. Gavin, C. Schultz, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 222–230.
- [294] A. Jain, O. Beutel, K. Ebell, S. Korneev, J. C. M. Holthuis, *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 360–371.
- [295] S. Bockelmann, J. M. Mina, S. Korneev, D. G. Hassan, D. Müller, A. Hilderink, H. C. Vlieg, R. Rajmakers, A. R. Heck, P. Haberkant, J. M. Holthuis, *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 515–530.
- [296] X. Jiang, Z. Zhu, H. Qin, P. Tripathi, L. Zhong, A. Elsherbini, S. Karki, S. M. Crivelli, W. Zhi, G. Wang, S. D. Spassieva, E. Bieberich, *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 166.
- [297] J. N. Kong, K. Hardin, M. Dinkins, G. Wang, Q. He, T. Mujadzic, G. Zhu, J. Bielawski, S. Spassieva, E. Bieberich, *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 4451–4465.
- [298] J. N. Kong, Z. Zhu, Y. Itokazu, G. Wang, M. B. Dinkins, L. Zhong, H. P. Lin, A. Elsherbini, S. Leanhart, X. Jiang, H. Qin, W. Zhi, S. D. Spassieva, E. Bieberich, *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 488–506.
- [299] P. Tripathi, Z. Zhu, H. Qin, A. Elsherbini, E. A. Roush, S. M. Crivelli, S. D. Spassieva, E. Bieberich, *Lipid Rafts: Methods and Protocols* (Ed.: E. Bieberich), Springer, New York, **2021**, 337–348.
- [300] D. Höglinger, A. Nadler, P. Haberkant, J. Kirkpatrick, M. Schifferer, F. Stein, S. Hauke, F. D. Porter, C. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114*, 1566–1571.
- [301] D. Höglinger, *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1949*, 95–103.
- [302] J. Morstein, M. Kol, A. J. E. Novak, S. Feng, S. Khayyo, K. Hinnah, N. Li-Purcell, G. Pan, B. M. Williams, H. Riezman, G. E. Atilla-Gokcumen, J. C. M. Holthuis, D. Trauner, *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 452–456.
- [303] M. Casasampere, E. Izquierdo, J. Casas, J. L. Abad, X. Liu, R. Xu, C. Mao, Y.-T. Chang, A. Delgado, G. Fabrias, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 13044–13051.
- [304] M. Dauner, E. Batroff, V. Bachmann, C. R. Hauck, V. Wittmann, *Bioconj. Chem.* **2016**, *27*, 1624–1637.
- [305] R. S. Erdmann, D. Toomre, A. Schepartz, *Super-Resolution Microscopy: Methods and Protocols* (Ed.: H. Erfle), Springer, New York, **2017**, 65–78.
- [306] H. Takakura, Y. Zhang, R. S. Erdmann, A. D. Thompson, Y. Lin, B. McNellis, F. Rivera-Molina, S.-n. Uno, M. Kamiya, Y. Urano, J. E. Rothman, J. Bewersdorf, A. Schepartz, D. Toomre, *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 773–780.

- [307] S.-n. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M. C. Tarhan, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita, Y. Urano, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 681–689.
- [308] M. Kol, R. Panatala, M. Nordmann, L. Swart, L. van Suijlekom, B. Cabukusta, A. Hilderink, T. Grabietz, J. G. M. Mina, P. Somerharju, S. Korneev, F. G. Tafesse, J. C. M. Holthuis, *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 962–973.
- [309] M. S. Sandbhor, J. A. Key, I. S. Strelkov, C. W. Cairo, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8669–8674.
- [310] J. L. Daughtry, W. Cao, J. Ye, J. M. Baskin, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 318–324.
- [311] A. P. Bussink, P. F. van Swieten, K. Ghauharali, S. Scheij, M. van Eijk, T. Wennekes, G. A. van der Marel, R. G. Boot, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleeft, *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 1417–1421.
- [312] G. L. Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 1451–1466.
- [313] R. J. DeBerardinis, C. B. Thompson, *Cell* **2012**, *148*, 1132–1144.
- [314] J. E. Markham, J. G. Jaworski, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1304–1314.
- [315] J. G. Mina, J. A. Mosely, H. Z. Ali, P. W. Denny, P. G. Steel, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1823–1830.
- [316] P. Pfister, *Synthese von 1-Azido-Sphingolipid-Derivaten*, Bachelorarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2019**.
- [317] P. Stenzel, *Entwicklung und Synthese von sphingolipidbasierten Inhibitoren der Sauren Sphingomyelinase*, Masterarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2020**.
- [318] F. S. Gibson, M. S. Park, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7503–7507.
- [319] E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190–6191.
- [320] P. Patschinski, C. Zhang, H. Zipse, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8348–8357.
- [321] S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815–3818.
- [322] M. Adler, S. Adler, G. Boche, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 193–209.
- [323] E. Prechalová, I. Votruba, M. Kotora, *J. Fluorine Chem.* **2012**, *141*, 49–57.
- [324] A. Gomtsyan, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 11–13.
- [325] R. V. Hoffman, N. Maslouh, F. Cervantes-Lee, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1045–1056.
- [326] M. A. Al Sazzad, T. Yasuda, M. Murata, J. P. Slotte, *Biophys. J.* **2017**, *112*, 976–983.
- [327] N. Matsumori, T. Yasuda, H. Okazaki, T. Suzuki, T. Yamaguchi, H. Tsuchikawa, M. Doi, T. Oishi, M. Murata, *Biochemistry* **2012**, *51*, 8363–8370.
- [328] W. Qu, K. Ploessl, H. Truong, M.-P. Kung, H. F. Kung, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3382–3385.
- [329] P. Sanllehi, M. Casasampere, J.-L. Abad, G. Fabriàs, O. López, J. Bujons, J. Casas, A. Delgado, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5441–5444.
- [330] A. K. Chatterjee, T.-L. Choi, D. P. Sanders, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360–11370.
- [331] T. R. Hoye, H. Zhao, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1123–1125.
- [332] Y. A. Lin, B. G. Davis, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 1219–1228.
- [333] J. Usta, S. E. Bawab, P. Roddy, Z. M. Szulc, Y. A. Hannun, A. Bielawska, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9657–9668.
- [334] P. Jean-Louis Hérisson, Y. Chauvin, *Makromol. Chem.* **1971**, *141*, 161–176.
- [335] C. Samojłowicz, M. Bieniek, K. Grela, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3708–3742.
- [336] R. H. Grubbs, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7117–7140.
- [337] S. J. Connon, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1900–1923.
- [338] M. S. Sanford, M. Ulman, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 749–750.
- [339] D. J. Nelson, S. Manzini, C. A. Urbina-Blanco, S. P. Nolan, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10355–10375.
- [340] T. P. Montgomery, A. M. Johns, R. H. Grubbs, *Catalysts* **2017**, *7*, 87.
- [341] P. E. Romero, W. E. Piers, R. McDonald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6161–6165.
- [342] F. D. Toste, A. K. Chatterjee, R. H. Grubbs, *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 7–10.
- [343] C. P. Casey, *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 192.
- [344] M. B. Herbert, R. H. Grubbs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5018–5024.
- [345] S. J. Meek, R. V. O'Brien, J. Llaveria, R. R. Schrock, A. H. Hoveyda, *Nature* **2011**, *471*, 461–466.
- [346] T. S. Ahmed, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1532–1537.
- [347] H. C. Brown, J. B. Campbell, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 389–395.

- [348] L. S. Liebeskind, J. Srogl, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11260–11261.
- [349] H. Prokopcová, C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2276–2286.
- [350] H.-G. Cheng, H. Chen, Y. Liu, Q. Zhou, *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7*, 490–508.
- [351] J. M. Villalobos, J. Srogl, L. S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15734–15735.
- [352] J. M. Holopainen, J. Lemmich, F. Richter, O. G. Mouritsen, G. Rapp, P. K. J. Kinnunen, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2459–2469.
- [353] J. A. Shabbits, L. D. Mayer, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1612*, 98–106.
- [354] G. G. Furin, O. A. Vyazankina, B. A. Gostevsky, N. S. Vyazankin, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2675–2749.
- [355] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, *1984*, 572–574.
- [356] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927–1930.
- [357] A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.
- [358] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
- [359] H. Imagawa, M. Oda, T. Takemoto, R. Yamauchi, T. Yoshikawa, H. Yamamoto, M. Nishizawa, H. Takahashi, M. Hashimoto, K. Yabiku, M. Nagahama, J. Sakurai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3868–3871.
- [360] J. Chen, N. K. Devaraj, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, *65*, 126–135.
- [361] 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, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8612–8614.
- [362] J. Fink, J. Seibel, E. Avota, *Lipid Rafts: Methods and Protocols* (Ed.: E. Bieberich), Springer, New York, **2021**, 313–325.
- [363] C. Hollmann, S. Werner, E. Avota, D. Reuter, L. Japtok, B. Kleuser, E. Gulbins, K. A. Becker, J. Schneider-Schaulies, N. Beyersdorf, *J. Immunol.* **2016**, *197*, 3130–3141.
- [364] Y. Zhou, M. S. Salker, B. Walker, P. Münzer, O. Borst, M. Gawaz, E. Gulbins, Y. Singh, F. Lang, *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *39*, 985–995.
- [365] C. Hollmann, T. Wiese, F. Dennstädt, J. Fink, J. Schneider-Schaulies, N. Beyersdorf, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2363–2363.
- [366] T. Wiese, F. Dennstädt, C. Hollmann, S. Stonawski, C. Wurst, J. Fink, E. Gorte, P. Mandasari, K. Domschke, L. Hommers, B. Vanhove, F. Schumacher, B. Kleuser, J. Seibel, J. Rohr, M. Buttman, A. Menke, J. Schneider-Schaulies, N. Beyersdorf, *Brain Communications* **2021**, *3*, fcab020.
- [367] C. B. Hollmann, *Einfluss der sauren Sphingomyelinase auf anti-virale T-Zellantworten im Masternvirus-Infektionsmodell*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2017**.
- [368] A. Bergfeld, P. Dasari, S. Werner, T. R. Hughes, W.-C. Song, P. Hortschansky, A. A. Brakhage, T. Hünig, P. F. Zipfel, N. Beyersdorf, *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 844–844.
- [369] A. L. Rice, L. Sacco, A. Hyder, R. E. Black, *Bull. W.H.O.* **2000**, *78*, 1207–1221.
- [370] S. Schneider-Schaulies, I. M. Klagge, V. ter Meulen, *Dendritic Cells and Virus Infection* (Ed.: A. Steinkasserer), Springer, Berlin, Heidelberg, **2003**, 77–101.
- [371] S. Schneider-Schaulies, J. Schneider-Schaulies, *Measles: Pathogenesis and Control* (Eds.: D. E. Griffin, M. B. A. Oldstone), Springer, Berlin, Heidelberg, **2009**, 243–269.
- [372] B. Aurangzeb, Y. B. Nisar, T. Hazir, F. Burki, M. Hassan, *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* **2005**, *15*, 547–551.
- [373] M. Cella, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 10–16.
- [374] E. Avota, S. Koethe, S. Schneider-Schaulies, *Cell. Microbiol.* **2013**, *15*, 161–169.
- [375] E. Avota, E. Gulbins, S. Schneider-Schaulies, *PLoS Path.* **2011**, *7*, e1001290.
- [376] E. Avota, S. Schneider-Schaulies, *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *34*, 20–26.
- [377] B. Stancevic, R. Kolesnick, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1728–1740.
- [378] M. Sauer, M. Heilemann, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7478–7509.
- [379] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176.
- [380] R. T. Borlinghaus, D. Eggert, C. Hamers, R. Reimer, F. van den Boom, *Romeis - Mikroskopische Technik* (Eds.: M. Mulisch, U. Welsch), Springer, Berlin, Heidelberg, **2015**, 43–61.
- [381] U. Endesfelder, M. Heilemann, *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1251*, 263–276.

- [382] A. Burgert, J. Schlegel, J. Bécam, S. Doose, E. Bieberich, A. Schubert-Unkmeir, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 6131–6135.
- [383] F. Chen, P. W. Tillberg, E. S. Boyden, *Science* **2015**, *347*, 543–548.
- [384] A. T. Wassie, Y. Zhao, E. S. Boyden, *Nat. Methods* **2019**, *16*, 33–41.
- [385] S. Truckenbrodt, C. Sommer, S. O. Rizzoli, J. G. Danzl, *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 832–863.
- [386] J. B. Chang, F. Chen, Y. G. Yoon, E. E. Jung, H. Babcock, J. S. Kang, S. Asano, H. J. Suk, N. Pak, P. W. Tillberg, A. T. Wassie, D. Cai, E. S. Boyden, *Nat. Methods* **2017**, *14*, 593–599.
- [387] T. J. Chozinski, A. R. Halpern, H. Okawa, H.-J. Kim, G. J. Tremel, R. O. L. Wong, J. C. Vaughan, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 485–488.
- [388] R. Götz, T. C. Kunz, J. Fink, F. Solger, J. Schlegel, J. Seibel, V. Kozjak-Pavlovic, T. Rudel, M. Sauer, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6173.
- [389] R.-B. Yan, F. Yang, Y. Wu, L.-H. Zhang, X.-S. Ye, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8993–8995.
- [390] P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6029–6032.
- [391] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron, *BioTechniques* **2004**, *37*, 790–802.
- [392] I. Ghai, S. Ghai, *Infection and drug resistance* **2018**, *11*, 523–530.
- [393] G. Beliu, A. J. Kurz, A. C. Kuhlemann, L. Behringer-Pliess, M. Meub, N. Wolf, J. Seibel, Z.-D. Shi, M. Schnermann, J. B. Grimm, L. D. Lavis, S. Doose, M. Sauer, *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 261.
- [394] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869–2872.
- [395] J. C. T. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6917–6920.
- [396] L. M. Pujol-Lereis, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3564.
- [397] N. Wolf, *Synthese multifunktionaler Farbstoffe und Linker zur Visualisierung biologischer Strukturen*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2020**.
- [398] M. Balci, *Basic ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy*, Elsevier, **2005**.
- [399] A. Niederwieser, A.-K. Späte, L. D. Nguyen, C. Jüngst, W. Reutter, V. Wittmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4265–4268.
- [400] A.-K. Späte, H. Bußkamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, V. Wittmann, *Bioconj. Chem.* **2014**, *25*, 147–154.
- [401] Y.-J. Lee, Y. Kurra, Y. Yang, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, W. R. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13085–13088.
- [402] H. Bußkamp, E. Batroff, A. Niederwieser, O. S. Abdel-Rahman, R. F. Winter, V. Wittmann, A. Marx, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10827–10829.
- [403] J. T. George, S. G. Srivatsan, *Bioconj. Chem.* **2017**, *28*, 1529–1536.
- [404] G. Cahiez, C. Chaboche, M. Jézéquel, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2733–2737.
- [405] P. G. Arduino, S. R. Porter, *J. Oral Pathol. Med.* **2008**, *37*, 107–121.
- [406] J. Lang, P. Bohn, H. Bhat, H. Jastrow, B. Walkenfort, F. Cansiz, J. Fink, M. Bauer, D. Olszewski, A. Ramos-Nascimento, V. Duhan, S.-K. Friedrich, K. A. Becker, A. Krawczyk, M. J. Edwards, A. Burchert, M. Huber, J. Friebus-Kardash, J. R. Göthert, C. Hardt, H. C. Probst, F. Schumacher, K. Köhrer, B. Kleuser, E. B. Babiychuk, B. Sodeik, J. Seibel, U. F. Greber, P. A. Lang, E. Gulbins, K. S. Lang, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1338.
- [407] F. Solger, *Central role of sphingolipids on the intracellular survival of Neisseria gonorrhoeae in epithelial cells*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2021**.
- [408] F. Solger, T. C. Kunz, J. Fink, K. Paprotka, P. Pfister, F. Hagen, F. Schumacher, B. Kleuser, J. Seibel, T. Rudel, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 215.
- [409] M. H. Lee, J. Byun, M. Jung, J. J. Yang, K.-H. Park, S.-Y. Moon, H. J. Lee, M. S. Lee, *Infect Chemother* **2015**, *47*, 60–63.
- [410] M. Unemo, W. M. Shafer, *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 587–613.
- [411] S. Peters, L. Kaiser, J. Fink, F. Schumacher, V. Perschin, J. Schlegel, M. Sauer, C. Stigloher, B. Kleuser, J. Seibel, A. Schubert-Unkmeir, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4300.
- [412] L. Kaiser, *Wirkmechanismus von Sphingolipiden und Sphingosin gegen mikrobielle Erreger*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2020**.
- [413] S. Peters, *The impact of sphingolipids on Neisseria meningitidis and their role in meningococcal pathogenicity*, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2021**.

- [414] H. Christensen, M. May, L. Bowen, M. Hickman, C. L. Trotter, *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 853–861.
- [415] D. A. Caugant, O. B. Brynildsrud, *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 84–96.
- [416] R. Z. Jafri, A. Ali, N. E. Messonnier, C. Tevi-Benissan, D. Durrheim, J. Eskola, F. Fermon, K. P. Klugman, M. Ramsay, S. Sow, S. Zhujun, Z. A. Bhutta, J. Abramson, *Popul. Health Metr.* **2013**, *11*, 17.
- [417] P. de Boer, J. P. Hoogenboom, B. N. G. Giepmans, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 503–513.
- [418] K. A. Sjollem, U. Schnell, J. Kuipers, R. Kalicharan, B. N. G. Giepmans, *Methods Cell Biol., Vol. 111* (Eds.: T. Müller-Reichert, P. Verkade), Academic Press, **2012**, 157–173.
- [419] Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, **2010**, 3123–3128.
- [420] B. Ren, M. Wang, J. Liu, J. Ge, X. Zhang, H. Dong, *Green Chem.* **2015**, *17*, 1390–1394.
- [421] A. Nudelman, Y. Bechor, E. Falb, B. Fischer, B. A. Wexler, A. Nudelman, *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 471–474.
- [422] J. Fink, F. Schumacher, J. Schlegel, P. Stenzel, D. Wigger, M. Sauer, B. Kleuser, J. Seibel, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 2203–2212.
- [423] J. Nixon-Abell, C. J. Obara, A. V. Weigel, D. Li, W. R. Legant, C. S. Xu, H. A. Pasolli, K. Harvey, H. F. Hess, E. Betzig, C. Blackstone, J. Lippincott-Schwartz, *Science* **2016**, *354*, aaf3928.
- [424] Y. Qi, T. Geib, A.-M. Huynh, G. Jung, D. A. Volmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 885–890.
- [425] H. Maruyama, K. Miyata, M. Mikame, A. Taguchi, C. Guili, M. Shimura, K. Murayama, T. Inoue, S. Yamamoto, K. Sugimura, K. Tamita, T. Kawasaki, J. Kajihara, A. Onishi, H. Sugiyama, T. Sakai, I. Murata, T. Oda, S. Toyoda, K. Hanawa, T. Fujimura, S. Ura, M. Matsumura, H. Takano, S. Yamashita, G. Matsukura, R. Tazawa, T. Shiga, M. Ebato, H. Satoh, S. Ishii, *Genet. Med.* **2019**, *21*, 44–52.
- [426] N. Üçeyler, S. Ganendiran, D. Kramer, C. Sommer, *Clin. J. Pain* **2014**, *30*, 915–920.
- [427] D. Shida, K. Takabe, D. Kapitonov, S. Milstien, S. Spiegel, *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 662–673.
- [428] M. Cao, C. Ji, Y. Zhou, W. Huang, W. Ni, X. Tong, J.-F. Wei, *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 2450–2460.
- [429] H. Alshaker, L. Sauer, D. Monteil, S. Ottaviani, S. Srivats, T. Böhler, D. Pchejetski, *Adv. Cancer Res., Vol. 117* (Ed.: J. S. Norris), Academic Press, **2013**, 143–200.
- [430] L. C. Edsall, J. R. Van Brocklyn, O. Cuvillier, B. Kleuser, S. Spiegel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12892–12898.
- [431] M. Fabišíková, M. Martinková, S. Hirková, J. Gonda, M. B. Pilátová, G. Gönciová, *Carbohydr. Res.* **2016**, *435*, 26–36.
- [432] H. Symolon, A. Bushnev, Q. Peng, H. Ramaraju, S. G. Mays, J. C. Allegood, S. T. Pruett, M. C. Sullards, D. L. Dillehay, D. C. Liotta, A. H. Merrill, Jr., *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 648–657.
- [433] I. de Miguel, B. Herradón, E. Mann, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1731–1736.
- [434] M. G. Martínez, *New sphingolipid probes for metabolism and trafficking studies*, Dissertation, Universität von Barcelona, **2012**.
- [435] N. Beckmann, D. Sharma, E. Gulbins, K. A. Becker, B. Edelmann, *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 331.
- [436] J. Fantini, M. Maresca, D. Hammache, N. Yahi, O. Delézay, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 173–179.
- [437] J. M. F. G. Aerts, M. Artola, M. van Eijk, M. J. Ferraz, R. G. Boot, *Frontiers in cell and developmental biology* **2019**, *7*, 324–324.
- [438] C. J. Tiffit, R. L. Proia, *Glycobiology* **2000**, *10*, 1249–1258.
- [439] G. Yang, J. Schmiege, M. Tsuji, R. W. Franck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3818–3822.
- [440] Z. Liu, H.-S. Byun, R. Bittman, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2974–2977.
- [441] Z. Liu, R. Bittman, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 620–623.
- [442] Z. Liu, A. N. Courtney, L. S. Metelitsa, R. Bittman, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1733–1737.
- [443] A. S. Altit, S. Bachan, D. R. Mootoo, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4654–4657.
- [444] J. N. Gorantla, A. Faseela, R. S. Lankalapalli, *Chem. Phys. Lipids* **2016**, *194*, 158–164.
- [445] J. L. Lau, M. K. Dunn, *Biorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 2700–2707.

- [446] R. I. Duclos, K. D. Blue, M. J. Rufo, X. Chen, J. J. Guo, X. Ma, W. I. Lencer, D. J. F. Chinnapen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127014.
- [447] J. Sui, M. He, Y. Wang, X. Zhao, Y. He, B. Shi, *Exp. Ther. Med.* **2019**, *18*, 3603–3614.
- [448] J. Guitton, C. L. Bandet, M. L. Mariko, S. Tan-Chen, O. Bourron, Y. Benomar, E. Hajduch, H. Le Stunff, *Cells* **2020**, *9*, 1682.
- [449] P. Saeedi, I. Petersohn, P. Salpea, B. Malanda, S. Karuranga, N. Unwin, S. Colagiuri, L. Guariguata, A. A. Motala, K. Ogurtsova, J. E. Shaw, D. Bright, R. Williams, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2019**, *157*, 107843.
- [450] C. D. Mathers, D. Loncar, *PLoS Med.* **2006**, *3*, e442.
- [451] J. M. Haus, S. R. Kashyap, T. Kasumov, R. Zhang, K. R. Kelly, R. A. Defronzo, J. P. Kirwan, *Diabetes* **2009**, *58*, 337–343.
- [452] E. Sokolowska, A. Blachnio-Zabielska, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*.
- [453] H. Yaribeygi, S. Bo, M. Ruscica, A. Sahebkar, *Diabet. Med.* **2020**, *37*, 11–19.
- [454] S. B. Russo, J. S. Ross, L. A. Cowart, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2013**, 373–401.
- [455] L. Japtok, E. I. Schmitz, S. Fayyaz, S. Krämer, L. J. Hsu, B. Kleuser, *FASEB J.* **2015**, *29*, 3357–3369.
- [456] E. Guillocheau, P. Legrand, V. Rioux, *Biochimie* **2020**, *169*, 144–160.
- [457] E. Guillocheau, C. Penhoat, G. Drouin, A. Godet, D. Catheline, P. Legrand, V. Rioux, *Food Chem. X* **2020**, *5*, 100081.
- [458] R. D. Williams, E. Wang, A. H. Merrill, Jr., *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *228*, 282–291.
- [459] N. Ragoussis, V. Ragoussis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3529–3534.
- [460] S. Desrat, P. J. Gray, M. R. Penny, W. B. Motherwell, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 8918–8922.
- [461] K. Lorber, A. Buettner, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 6681–6688.
- [462] M. G. Banwell, D. T. J. Loong, *Heterocycles* **2004**, *62*, 713–734.
- [463] R. Appel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14*, 801–811.
- [464] V. Blot, U. Jacquemard, H.-U. Reissig, B. Kleuser, *Synthesis* **2009**, *2009*, 759–766.
- [465] Z. M. Szulc, Y. A. Hannun, A. Bielawska, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7821–7824.
- [466] V. B. Oza, R. C. Corcoran, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3680–3684.
- [467] R. Rabinowitz, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2975–2978.
- [468] Z. Liu, N. Yasuda, M. Simeone, R. A. Reamer, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11792–11796.
- [469] G. Pons, D. Riba, M. Casasampere, E. Izquierdo, J.-L. Abad, G. Fabriàs, P. G. Rodríguez Ortega, J. J. López-González, M. Montejo, J. Casas, A. Delgado, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 419–429.
- [470] P. Sanllehí, J.-L. Abad, J. Bujons, J. Casas, A. Delgado, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 905–915.
- [471] G. Karsai, M. Lone, Z. Kutalik, J. T. Brenna, H. Li, D. Pan, A. von Eckardstein, T. Hornemann, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 1889–1897.
- [472] D. K. Olson, F. Fröhlich, R. V. Farese, T. C. Walther, *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1861*, 784–792.
- [473] S. Choi, A. J. Snider, *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015*, 520618.
- [474] K. Hanada, *Jpn. J. Infect. Dis.* **2005**, *58*, 131–148.
- [475] V. Brinkmann, A. Billich, T. Baumruker, P. Heining, R. Schmouder, G. Francis, S. Aradhya, P. Burtin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 883–897.
- [476] F. Leypoldt, A. Münchau, F. Moeller, M. Bester, C. Gerloff, C. Heesen, *Neurology* **2009**, *72*, 1022–1024.
- [477] L. J. Heung, C. Luberto, M. Del Poeta, *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 28–39.
- [478] E. J. Yager, K. V. Konan, *Viruses* **2019**, *11*, 912.
- [479] J. Schneider-Schaulies, S. Schneider-Schaulies, *Biol. Chem.* **2015**, *396*, 585–595.
- [480] J. A. Rasmussen, A. Hermetter, *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 436–460.
- [481] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.
- [482] E. C. Izgu, S. S. Oh, J. W. Szostak, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3684–3686.
- [483] A. Taniguchi, N. Hara, M. Shizuma, N. Tajima, M. Fujiki, Y. Imai, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 2859–2864.
- [484] R. C. So, R. Ndonye, D. P. Izmirian, S. K. Richardson, R. L. Guerrero, A. R. Howell, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3233–3235.

- [485] E. C. Garnier-Amblard, S. G. Mays, R. F. Arrendale, M. T. Baillie, A. S. Bushnev, D. G. Culver, T. J. Evers, J. J. Holt, R. B. Howard, L. S. Liebeskind, D. S. Menaldino, M. G. Natchus, J. A. Petros, H. Ramaraju, G. P. Reddy, D. C. Liotta, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 438–443.
- [486] J. Llaveria, Á. Beltrán, W. M. C. Sameera, A. Locati, M. M. Díaz-Requejo, M. I. Matheu, S. Castellón, F. Maseras, P. J. Pérez, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 5342–5350.
- [487] D. Chan-Seng, J.-F. Lutz, *ACS Macro Lett.* **2014**, 3, 291–294.
- [488] J. A. Morales-Serna, O. Boutoureira, A. Serra, M. I. Matheu, Y. Díaz, S. Castellón, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 2657–2660.
- [489] O. David, W. J. N. Meester, H. Bieräugel, H. E. Schoemaker, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4373–4375.
- [490] A. J. Rhodes, T. J. Deming, *ACS Macro Lett.* **2013**, 2, 351–354.
- [491] T. A. Strom, A. R. Barron, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 4764–4766.
- [492] C.-M. Chong, S. Gao, B.-Y. Chiang, W.-H. Hsu, T.-C. Lin, T.-C. Chen, C.-H. Lin *ChemBioChem* **2011**, 12, 2306–2309.
- [493] M. Adamkiewicz, D. O'Hagan, G. Hähner, *Langmuir* **2014**, 30, 5422–5428.
- [494] M. Shimojo, K. Matsumoto, M. Hatanaka, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9281–9288.
- [495] J. R. Vyvyan, C. L. Holst, A. J. Johnson, C. M. Schwenk, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2263–2265.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
ADIBO	Azadibenzocyclooctin (= DBCO, Dibenzocyclooctin)
AG	Arbeitsgruppe
Äq.	Äquivalent(e)
ASM	saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
BARAC	Biarylazacyclooctin
BCN	Bicyclononin
BMDMs	aus Knochenmark stammende Makrophagen (<i>bone marrow-derived macrophages</i>)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BODIPY	Bordipyrrromethen (<i>boron-dipyrrromethene</i>)
BTAA	2-(4-((Bis((1-(<i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)essigsäure
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CAAPs	Ceramid-aktivierte Proteinphosphatasen
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDase	Ceramidase
CD(9/25/28/4 ⁺)	Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (<i>cluster of differentiation</i>)
Cer	Ceramid
CerK	Ceramidkinase
CerS	Ceramidsynthase
CERT	Ceramid-Transfer-Protein
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision-induced dissociation</i>)
CLEM	korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (<i>correlative light-electron microscopy</i>)
CoA	Coenzym A
COD	Cycloocta-1,5-dien
COS	Fibroblasten-Zelllinie (<i>CV-1 in origin, carrying SV40</i>)

COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019 (<i>coronavirus disease 2019</i>)
CST	Cerebrosidsulfotransferase
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cyloaddition
CuTC	Kupfer(I)-thiophen-2-carboxylat
Cy	Cyclohexan
Cy(3/5)	Cyanin (3/5)
C1P	Ceramid-1-phosphat
C1PP	Ceramid-1-phosphatphosphatase
d	Tage
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
dba	Dibenzylidenacetone
DBU	1,8-Diazabi-cyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEGS	Dihydroceramid-desaturase
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
dhCer	Dihydroceramid
dhSph	Dihydrosphingosin, Sphinganin
DIBAC	Dibenzoazacyclooctin (= DBCO, Dibenzocyclooctin)
DIBO	Dibenzocyclooctin
DIFBO	Difluorbenzocyclooctin
DIFO	Difluorcyclooctin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
<i>d</i> STORM	direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (<i>direct stochastic optical reconstruction microscopy</i>)
EDC	3-(Ethyliminomethylidenamino)- <i>N,N</i> -dimethylpropan-1-amin
ER	endoplasmatisches Retikulum
Et	Ethyl
Et ₂ O	Diethylether
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
EWG	elektronenziehende Gruppe (<i>electron withdrawing group</i>)

ExM	Expansionsmikroskopie
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FB ₁	Fumonisin B ₁
FD	Morbus Fabry (<i>Fabry disease</i>)
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FRAP	Fluoreszenzwiederherstellung nach dem Photobleichen (<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FTY720	Fingolimod, 2-Amino-2-(2-(4-octylphenyl)ethyl)propan-1,3-diol
g	Gramm
GA	Glutaraldehyd
Gb3	Globotriaosylceramid, Ceramid-Trihexosid
ges.	gesättigt
Gew.-%	Gewichtsprozent
GalCase	Galactosylceramidase
GalCer	Galactosylceramid
GalCS	Galactosylceramidsynthase
GCase	Glucosylceramidase
GCS	Glucosylceramidsynthase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GluCer	Glucosylceramid
Grubbs II-Kat.	Benzyliden[1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinyliden]-dichlor-(tricyclohexylphosphin)ruthenium, Grubbs II-Katalysator
GSL	Glycosphingolipide
GT	Glycosyltransferase
h	Stunde(n)
HATU	1-[Bis(dimethylamin)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]pyridinium-3-oxid-hexafluorophosphat
HBTU	3-[Bis(dimethylamin)methylumyl]-3 <i>H</i> -benzotriazol-1-oxidhexafluorophosphat
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) von Henrietta Lacks (Spenderin)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriämid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSV-1	Herpes-simplex-Virus Typ 1
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
Hz	Hertz
IAOC	intramolekulare 1,3-dipolare Azid-Olefin-Cycloaddition

iEDDA	Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (<i>inverse electron-demand Diels-Alder reaction</i>)
ILVs	intraluminale Vesikel
IMD	invasive Meningokokkenerkrankung (<i>invasive meningococcal disease</i>)
ⁱ PrOH	<i>iso</i> -Propanol
JMU	Julius-Maximilians-Universität
k	Geschwindigkeitskonstante
KDSR	3-Ketosphinganine-reduktase
LacCS	Lactosylceramidsynthase
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LCB	<i>long-chain base</i>
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
M	Molarität [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]
MA-NHS	Methacrylsäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
MBC	minimale bakterizide Konzentration (<i>minimal bactericidal concentration</i>)
mCling	membranbindende Fluorophor-Cystein-Lysin-Palmitoyl-Gruppe
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
(+/-)-M-Effekt	(positiver/negativer) mesomerer Effekt
MeOH	Methanol
MERS-CoV	<i>middle east respiratory syndrome coronavirus</i>
mg	Milligramm
MIC	minimale Hemmkonzentration (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
min	Minute(n)
MRM	mehrfache Reaktionsüberwachung (<i>multiple reaction monitoring</i>)
Ms	Mesyl
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MVB	multivesikuläres Körperchen (<i>multivesicular body</i>)
Na-Asc.	Natriumascorbat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBD	Nitrobenzoxadiazol
NEt ₃	Triethylamin
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
nmol	Nanomol
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (<i>nuclear Overhauser effect</i>)
NPK	Niemann-Pick-Krankheit
OCT	Cyclooctin
p. a.	zur Analyse (<i>pro analysi</i>)

pac	photoaktivierbar und clickbar (<i>photoactivatable and clickable</i>)
Pal-d ₃	16,16,16-d ₃ -Palmitinsäure
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mono-nuclear cells</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
Ph	Phenyl
PKC (ζ)	Proteinkinase C (Isotyp ζ)
PKH	Proteinkinase B-aktivierendes Kinasehomolog
PP	Proteinphosphatase
Pra1	pH-reguliertes Protein
Prx3	Peroxiredoxin 3
Py	Pyridin
QTOF	Quadrupol-Flugzeit (<i>Quadrupol-Time-of-Flight</i>)
quant.	quantitativ
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RP18	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
SARS-CoV-2	schweres akutes Atemwegssyndrom-Coronavirus-Typ 2 (<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>)
Sec61B	Sec61 Translocon β, Transmembranprotein
SEM	Rasterelektronenmikroskopie (<i>scanning electron microscopy</i>)
SiaT	Sialyltransferase
SIM	strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (<i>structured illumination microscopy</i>)
SiR-Tz	Silicium-Rhodamin-Tetrazin-Farbstoff
SK	Sphingosinkinase (= SphK)
SKI-II	4-((4-(4-Chlorphenyl)-2-thiazolyl)amino)phenol, Sphingosinkinaseinhibitor 2
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
SMS	Sphingomyelinsynthase
S _N 2	nukleophile Substitution 2. Ordnung
SPAAC	spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (<i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>)
Sph	Sphingosin
SphK	Sphingosinkinase (= SK)
SPL	Sphingosin-1-phosphatlyase
SPS	Lösungsmittelreinigungssystem (<i>solvent purification system</i>)
SPT	Serin-Palmitoyl-Transferase

SRM	selektive Reaktionsüberwachung (<i>selected reaction monitoring</i>)
STED	Fluoreszenzlöschung durch stimulierte Emission (<i>stimulated emission depletion</i>)
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PP	Sphingosin-1-phosphatphosphatase
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TCO	<i>trans</i> -Cycloocten
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid, Triflatanhydrid
TGEV	übertragbares Gastroenteritis-Coronavirus (<i>transmissible gastroenteritis virus</i>)
THF	Tetrahydrofuran
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amin
T _{Konv}	konventionelle T-Zellen
TMS	Trimethylsilyl
TPA	(<i>E</i>)-Hexadec-9-ensäure, <i>trans</i> -Palmitinsäure (<i>trans-palmitic acid</i>)
TQ	Triple-Quadrupol
t _R	Retentionszeit
T _{Reg}	regulatorische T-Zellen
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenylpolyethylenglykol, Octoxinol 9
Ts	Tosyl
T2D	Typ 2-Diabetes
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UDP-6AzGal	UDP-aktivierte 6-Desoxyazidogalactose
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v. a.	vor allem
Vis	sichtbar (<i>visible</i>)
Vol.-%	Volumenprozent
YPK	Hefeproteinkinase (<i>yeast protein kinase</i>)
z. B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge
μ	Mikro
°C	Grad Celcius
(1/2/3)D	(ein-/zwei-/drei-)dimensional
3KS	3-Ketosphinganin

9.1.1 Abkürzungen NMR

app	scheinbar (<i>apparent</i>)
br	breit (<i>broad</i>)
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
d	Dublett
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
m	Multipllett
MHz	Megahertz
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
od.	oder
ppm	Teile von einer Million (<i>parts per million</i>)
q	Quartett
s	Singulett
t	Triplett
zus.	zusammen
δ	chemische Verschiebung

9.1.2 Abkürzungen Massenspektrometrie

APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie (<i>high-resolution mass spectrometry</i>)
ber.	berechnet
gef.	gefunden
M	Molekül
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
$\Delta m/z$	Massengenauigkeit

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich (Julian Fink, geboren am 13.04.1992 in Heilbronn) die Dissertation mit dem Titel

„Synthese von molekularen Werkzeugen zur Visualisierung und Untersuchung des Sphingolipidmetabolismus und weiterer biologischer Prozesse“

selbständig angefertigt, übernommene Inhalte eindeutig gekennzeichnet und die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Ich erkläre außerdem, dass ich die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen und insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet habe, die gegen Entgelt Betreuerinnen bzw. Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich habe früher, außer den mit dem Promotionsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Die eingereichte und oben genannte Dissertation habe ich weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät, mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt.

Würzburg, den _____

Julian Fink