

**Entwicklung einer Aufreinigungs- und  
Immobilisierungsstrategie von Enzymen für  
Durchflussreaktoren  
und  
chemoenzymatische Studien am Granaticin**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Hannover

zu Erlangung des Grades  
**Doktorin der Naturwissenschaften**  
**- Dr. rer. nat. -**  
genehmigte Dissertation

von

Diplom-Chemikerin Csilla Kiss  
Geboren am 12.07.1977 in Bielefeld



**Entwicklung einer Aufreinigungs- und  
Immobilisierungsstrategie von Enzymen für  
Durchflussreaktoren  
und  
chemoenzymatische Studien am Granaticin**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Hannover

zu Erlangung des Grades  
**Doktorin der Naturwissenschaften**  
**- Dr. rer. nat. -**  
genehmigte Dissertation

von

Diplom-Chemikerin Csilla Kiss  
Geboren am 12.07.1977 in Bielefeld

Referent: Prof. Dr. A. Kirschning

Koreferent: Prof. Dr. H. Meyer

Tag der Promotion: 24.05.2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2002 bis März 2006 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover angefertigt.

Hierdurch versichere ich an Eides Statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Ich versichere an Eides Statt, dass diese Dissertation nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, den 30.03.2006

Referent: Prof. Dr. A. Kirschning

Koreferent: Prof. Dr. H. Meyer

Tag der Promotion: 24.05.2006

Ein Mensch hat dreierlei Wege, klug zu handeln:

Erstens: Durch Nachdenken – das ist der edelste.

Zweitens: Durch Nachahmen – das ist der einfachste.

Drittens: Durch Erfahrung – das ist der bitterste.



## **Vorwort**

Die hier vorliegende Arbeit wurde zwischen August 2002 und März 2006 an der Universität Hannover im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Kirschning angefertigt. Sie behandelt zwei sehr verschiedene Themengebiete, die sowohl aus inhaltlichen Gründen, als auch zum besseren Verständnis nicht in nur einem Kapitel beschrieben werden können. Aus diesen Gründen, und auch, um beiden Themen gerecht zu werden, wurde diese Arbeit in zwei getrennte Kapitel unterteilt. Im ersten Kapitel werden die Arbeiten zur Entwicklung einer Aufreinigungs- und Immobilisierungsstrategie von Enzymen für Durchflussreaktoren beschrieben. Die Chemoenzymatischen Studien am Granaticin werden im zweiten Teil behandelt.

# Zusammenfassung

Csilla Kiss

## Entwicklung einer Aufreinigungs- und Immobilisierungsstrategie von Enzymen für Durchflussreaktoren und chemoenzymatische Studien am Granaticin

Schlagworte: NTA-Linker – Enzymimmobilisierung – Polymermatrix - PASSflow – chemoenzymatische Umsetzungen – vorläuferdirigierte Biosynthese - Biotransformationen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift wurde ein Durchflussreaktorsystem auf NTA-Basis zur reversiblen Immobilisierung und Aufreinigung von Enzymen entwickelt, welches für chemoenzymatische Umsetzungen mit immobilisierten Enzymen eingesetzt werden konnte. Hierbei wurde zunächst ein neues NTA-Linkersystem auf Basis von Tyrosin entwickelt und mit dem bekannten System auf Lysin-Basis vergleichend hinsichtlich der Kapazität und Aufreinigungsfähigkeit von Enzymen untersucht. Die verwendete polymere Matrix wurde bezüglich der Immobilisationsfähigkeit des NTA-Linkersystems und der Aktivität der immobilisierten Enzyme optimiert. Erste Versuche zur chemoenzymatischen Umsetzung von Benzaldehyd zu *R*-Benzoin mit immobilisierter Benzaldehydlyase konnten erfolgreich durchgeführt werden. Anschließend wurde die Technik auf das PASSflow-Reaktorsystem übertragen und für dieses optimiert. Chemoenzymatische Umsetzungen im Durchflussreaktor an verschiedenen Substraten mit unterschiedlichen Enzymen konnten so durchgeführt werden. Zusätzlich wurden Esterspaltungen mit mehreren Lipasen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sie eine Selektivität zur Spaltung von Estern sekundärer Alkohole in Anwesenheit von Estern primärer Alkohole aufweisen, die bei Vergleichsversuchen in Lösung nicht aufgetreten waren.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene aromatische C-Glycoside als Biosynthesevorläufer ausgehend von Tri-O-acetyl-D-glucal synthetisiert. Diese wurden abschließend in Verfütterungsexperimenten mit *Streptomyces violaceoruber* eingesetzt. Hierzu wurden Studien zur Fermentation durchgeführt und ein Verfütterungsprotokoll erstellt. Die Metabolisierung der Biosynthesevorläufer ist noch nicht vollständig verstanden.

## Abstract

Csilla Kiss

### **Development of a purification and immobilization strategy of enzymes in continuous flow reactors und chemoenzymatic studies of Granaticin**

Key words: NTA-matrix – enzyme immobilization – polymeric matrix – *PASSflow* – chemoenzymatic transformations – precursor directed biosynthesis - biotransformations

During this Ph. D. thesis an NTA-based continuous flow reactor system for reversible purification and immobilization of enzymes was developed. This system was used for chemoenzymatic transformations with immobilized enzymes. Initially, a new tyrosine-based NTA-matrix was developed and compared with the well known lysine-based NTA-matrix for capacity and purification abilities of enzymes. The polymer matrix was optimized towards immobilization capability of the NTA matrix and the activity of the immobilized enzymes. First studies of the chemoenzymatic transformation of benzaldehyde to (R)-benzoine with immobilized benzaldehyde lyase have been carried out successfully. Afterwards this technique was transformed into and optimized in the *PASSflow* reactor system. Chemoenzymatic transformations in a continuous flow reactor with variable substrates and enzymes were carried out. In addition, ester cleavage with different lipases were performed. The lipases showed selectivity for the cleavage of secondary esters in the presence of primary esters. This selectivity was not observed during the experiments with lipases in solution.

During the second part of this Ph.D. thesis different compounds for biotransformations were synthesised starting from tri-*O*-acetyl-D-glucal or di-*O*-acetyl-L-rhamnol respectively. These precursors were fed to *streptomyces violaceoruber* and a feeding protocol was generated. The metabolisation of the precursors is not fully understood yet.

# Inhaltsverzeichnis

## Kapitel 1 Entwicklung einer Aufreinigungs- und Immobilisierungsstrategie von Enzymen für Durchflussreaktoren

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Enzyme in der organischen Chemie	1
1.2. Lyasen / Aldolasen in der organischen Synthese	4
1.3. Lipasen in der organischen Synthese	6
1.4. Enzyme in Industrieprozessen	8
1.5. Immobilisierung von Enzymen	10
1.5.1. Immobilisierung durch adsorbtive Bindung	11
1.5.2. Immobilisierung durch kovalente Bindung	12
1.5.3. Immobilisierung durch Matrixeinhüllung	13
1.5.4. Immobilisierung durch Membranabtrennung	13
1.6. PASSflow-Technik	15
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3. Entwicklung des Chelatlinkersystems</b>	<b>20</b>
3.1. Synthese der IMAC Bausteine	20
3.1.1. Synthese des Lysinlinkers	21
3.1.2. Synthese des Tyrosinlinkers	22
3.2. Polymermatrices für Enzymimmobilisierung	25
3.2.1. Exemplarische Darstellung des Polymeres vom Typ 3	26
3.3. Anbindung der Linker an die Harze	26
3.3.1. Anbindung des Lysinlinkers an das Polymer vom Typ 3	26
3.3.2. Optimierung der Harzbeladung mit dem Tyrosinlinker	27
3.4. Optimierung der Harzbeladung mit dem Tyrosinlinker	31
3.5. Expression von BAL in E. coli	33
3.6. Beladung der mit dem Tyrosinlinker beladenen Polymere (Typ 1 – 5) mit BAL aus der Zellyse von E. coli	33
3.7. Umsetzung von Benzaldehyd und Synthese von (R)-Benzoin mittels immobilisierter Benzaldehydlyase.	38
3.8. Maximale Beladung der Polymere (Typ 3) mit BAL	39

3.9. Umsetzungen von Benzaldehyd mit Festphasen-gebundener Benzaldehydlyase – Vergleich der Linkersysteme	41
3.9.1. Optimierung des Reaktionspuffers und Bestimmung der Enzym-Auswaschungen (leaching)	41
3.9.2. Umsetzung von Benzaldehyd mit dem Lysin-Harz	43
3.9.3. Umsetzung von Benzaldehyd mit dem Tyrosin-Harz	44
3.9.4. Wiederverwendbarkeit des Tyrosin-Harzes	46
3.10. Vergleichende Untersuchung zur Enzymimmobilisierung auf PASSflow-Säulen	48
3.10.1. Beladung der PASSflow-Säulen mit BAL	50
3.11. Verwendung von Lipasen – immobilisiert auf PASSflow-Säulen	54
3.11.1. Immobilisierung von schon gereinigte Enzymen	54
3.11.2. Überprüfung der Aktivität und des Leachings immobilisierter Lipasen	56
3.12. Umsetzungen mit immobilisierten Lipasen	57
3.12.1. Entschützung von Tri-O-acetyl-D-glucal	57
3.12.2. Umsetzungen von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester mit den Lipasen	60
3.12.3. Darstellung von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester	60
3.12.4. Entschützung von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester mittels immobilisierter Lipasen	61
<b>4. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>62</b>

## Kapitel 2 Chemoenzymatische Studien am Granaticin

<b>5. Einleitung</b>	<b>65</b>
5.1. Antibiotika	65
5.2. Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und DNA	67
5.2.1. Kovalente Bindungsbildung und strangbruchinduzierende Interaktionen mit der DNA	68
5.2.2. Interkalation in die DNA	69
5.2.3. Inhibitoren der Ribonucleinsäurebiosynthese	71
5.3. Granaticin	72
5.3.1. Biosynthese von Granaticin	73
5.4. Synthetische Zugänge zu Granaticin	77
5.5. Biotransformationsstrategien	78

<b>6. Zielsetzung</b>	<b>80</b>
<b>7. Darstellung der Biosynthesevorläufer</b>	<b>82</b>
7.1. Synthese des Biosynthesevorläufers 95 mittels 3,4-Di-O-benzyl-D-rhamnal und 1,5-Dihydroxynaphthalin	82
7.1.1. Synthese des 3,4-Di-O-benzyl-D-rhamnals	83
7.1.2. Darstellung des C-Glycosids 105	84
7.1.2.1. Darstellung des Glycosyldonors 111	84
7.1.2.2. Mechanismus zur Darstellung von C-Arylglycosiden	86
7.1.2.3. Glycosylierung von 1,5-Dihydroxynaphthalin	88
7.2. Strategie zur Synthese von 95 ausgehend von 105	89
7.2.1. Debenzylierung von 105	90
7.3. Darstellung von 92 mittels 3,4-Di-O-acetyl-D-rhamnal und 1,5-Dihydroxy-naphthalin	92
7.3.1. Darstellung des Glycosyldonors	92
7.3.2. Darstellung und Entschützung des C-Arylglycosids 121	93
7.3.3. Selektive Silylierung zum Glycosid 114 und Oxidation zu 115	96
7.4. Darstellung von 95 über 3,4-Di-O-acetyl-D-rhamnal und 5-(Benzyloxy)-naphthalin-1-ol	98
7.4.1. Zusammenfassung der geänderten Strategie	98
7.4.2. Synthese der Verbindung 129 ausgehend von 1,5-Dihydroxynaphthalin	100
7.4.3. Synthese des Arylglycosids 95 ausgehend von 129	101
7.5. Synthese von 96 ausgehend von 3,4,-Di-O-acetyl-L-rhamnal (134) und 127	102
7.6. Synthese des Arylglycosids 94 ausgehend von 3,4,-Di-O-acetyl-D-rhamnal und 1-Naphthol	103
7.7. Synthese des Arylglycosids 98 ausgehend von 3,4,-Di-O-acetyl-L-rhamnal und 1-Naphthol	105
7.8. Studien zur Synthese eines arylglycosidischen Vorläufers mit verändertem Oxidationsmuster am Aromaten	106
7.9. Vorläuferdirigierte Biosynthese mit den Bausteinen 94, 95, 98 und 99	108
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>114</b>

<b>9. Experimenteller Teil</b>	<b>118</b>
9.1. Allgemeines	118
9.2. Verwendete Puffer und andere Lösungen	121
9.3. Verwendete Nährmedien	127
9.4. Allgemeine Arbeitsmethoden	130
9.5. Versuche zu Kapitel 3.1	135
9.6. Versuche zu Kapitel 3.2	141
9.7. Versuche zu Kapitel 3.3	142
9.8. Versuche zu Kapitel 3.4	143
9.9. Versuche zu Kapitel 3.5	145
9.10. Versuche zu Kapitel 3.6	146
9.11. Versuche zu Kapitel 3.7	147
9.12. Versuche zu Kapitel 3.8	149
9.13. Versuche zu Kapitel 3.9	151
9.14. Versuche zu Kapitel 3.10	153
9.15. Versuche zu Kapitel 3.12	156
9.16. Versuche zu Kapitel 4	162
9.17. Versuche zu Kapitel 7.1	165
9.18. Versuche zu Kapitel 7.2	169
9.19. Versuche zu Kapitel 7.3	170
9.20. Versuche zu Kapitel 7.4	176
9.21. Versuche zu Kapitel 7.5	186
9.22. Versuche zu Kapitel 7.6	196
9.23. Versuche zu Kapitel 7.7	206
9.24. Versuche zu Kapitel 7.8	215
9.25. Versuche zu Kapitel 7.9	219

## Abkürzungsverzeichnis

abs.	Absorption
AIBN	Azobisisobutyronitril
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Äq.	Äquivalente
Ar	Aryl-
ARO	Aromatase
b	breit
BAL	Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase
BnBr	Benzylbromid
BSA	Rinderserumalbumin
BsubNBE	<i>p</i> -Nitrobenzylesterase aus <i>Bacillus subtilis</i>
ca.	circa
COSY	Korrelationsspektroskopie
CYC	Cyclase
Cyc	Cyclohexan
d	Dublett (NMR-Analytik)
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTDP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
ee	Enantiomerenüberschuss
EE	Essigsäureethylester
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GC	Gaschromatographie
His <sub>6</sub> -tag	Sequenz aus sechs hintereinander folgenden Histidinmolekülen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography gefolgt von Massenspektrometrie
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
Hz	Hertz
IPTG	1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
IR	Infrarotspektroskopie
IR	Infrarot

J	Kopplungskonstante ( $^1\text{H-NMR}$ )
kat.	katalytisch
KPi	Kaliumphosphatpuffer
KR	Ketoreduktase
LB-Medium	Lauria-Bertrani-Medium
Lipase PS	Lipase aus <i>Pseudomonas stutzeri</i>
Lsg	Lösung
m	Multiplett (NMR-Analytik)
MEM-Cl	Methoxyethoxymethyl-chlorid
min	Minute(n)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NMP	N-Methylpyrrolidinon
NMR	nuclear magnetic resonance
NTA	Nitrilotriacetat
OD <sub>x</sub>	optische Dichte
ORF	Open reading frame – noch nicht eindeutig zugeordnet
p	pseudo, primär (NMR-Analytik)
PASSflow	Polymer assisted solution phase synthesis in the flowthrough mode
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PFEI	Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PKS	Polyketidsynthase
ppm	parts per million
p-Tos-Cl	para-Toluolsulfonsäurechlorid
Py	Pyridin
q	Quartett ( $^1\text{H-NMR}$ ), quartär ( $^{13}\text{C-NMR}$ )
quint.	Quintett
Rkt.	Reaktion
RmIC	dTDP-4-Dehydrorhamnose-3,5-epimerase
RmID	dTDP-4-Dehydrorhamnose-reduktase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett ( $^1\text{H-NMR}$ ), sekundär ( $^{13}\text{C-NMR}$ ), stark (Intensität im IR)
sec	Sekunde(n)
SDE	Esterase aus <i>Streptomyces diastatochromogenes</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
Std.	Stunde(n)
t	Triplett ( $^1\text{H-NMR}$ ), tertiär ( $^{13}\text{C-NMR}$ )
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
ThDP	Thiamindiphosphat

THF	Tetrahydrofuran
TMEDA	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TMS-OTf	Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt

## 1. Einleitung

### 1.1 Enzyme in der organischen Chemie

Da katalytischen Methoden in der organischen Chemie seit jeher viel Interesse entgegengebracht wurde, erfreuen sich Enzyme als sehr effiziente Alternative zu klassischen Katalysatoren wachsender Beliebtheit. Umsetzungen mit Enzymen verlaufen unter milden Reaktionsbedingungen<sup>1</sup>, wie niedriger Temperatur und neutralen pH-Werten und führen dabei hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivitäten. So werden sie seit der Mitte der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts in der organischen Synthese verwendet. Inzwischen haben eine Fülle von verschiedenen Enzymen Einzug vor allem in das Gebiet der Naturstoffsynthese gehalten, da es hier bedingt durch die wachsenden Herausforderungen der stereoselektiven Synthesestrategien immer wieder zu Schwierigkeiten kommt, das Ziel auf rein chemisch synthetischem Weg zu erreichen. Vor allem die damit verbundene Zeit- und Geldersparnis lässt die Anzahl der Anwendungen der Chemoenzymatik in der Naturstoffsynthese und vor allem in der Darstellung von chiralen Buildingblocks stetig steigen. So werden Lipasen<sup>2</sup>, Oxidoreduktasen<sup>3</sup>, Hydrolasen<sup>4</sup>, Lyasen<sup>5</sup>, und Isomerasen immer häufiger in organischen Synthesen zum Einsatz gebracht<sup>6</sup>. Die Methoden ihrer Anwendung werden immer weiter entwickelt.

---

<sup>1</sup> a) H. E. Schoemaker, D. Mink, M. Wubbolts, *Science*, **2003**, 299, 1694 – 1697; b) A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature*, **2001**, 409, 258 – 268.

<sup>2</sup> a) D. Wikteliuss, *Synlett*, **2005**, 13, 2113 – 2114; b) M. Haddad, M. Larchevêque, *Tetrahedron Asymmetry*, **2005**, 16, 2243 – 2247; c) M. Edin, J. - E. Bäckvall, A. Córdova, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 7697 - 7701; d) N. Armesto, M. Ferrero, S. Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 5784 - 5787.

<sup>3</sup> a) M. Müller, M. Wolberg, T. Schubert, W. Hummel, *Adv. Biochem. Engin./Biotech.*, **2005**, 92, 261 – 287; b) S. Fernández, V. Gotor-Fernández, M. Ferrero, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.*, **2002**, 6, 453 – 469; c) G. Carrea, G. Ottolina, *Biocat. Biotrans.*, **2000**, 18, 119 – 132; d) M. Frede, E. Steckhan, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 5063 – 5066;

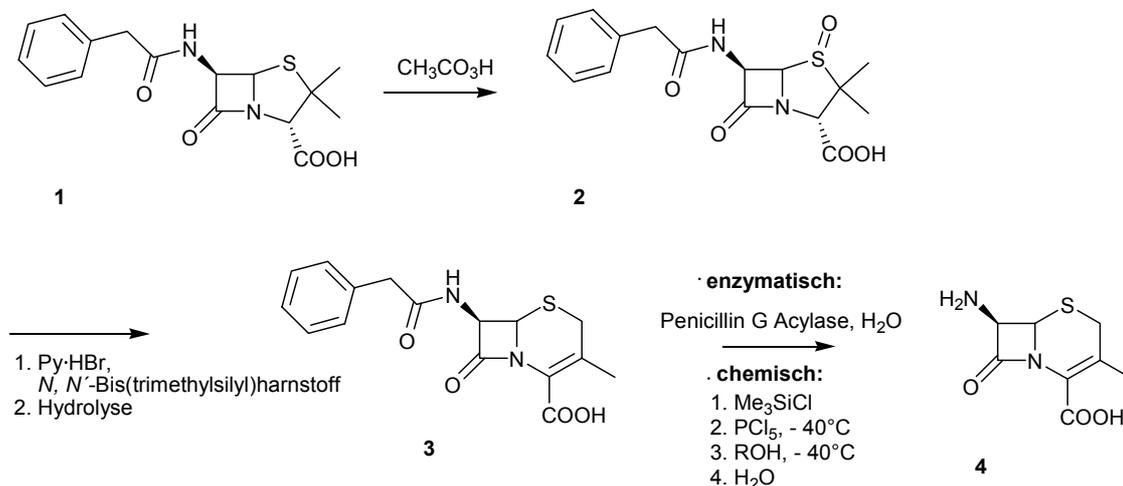
<sup>4</sup> a) J. Sukumaran, J. Van Gool, U. Hanefeld, *Enzyme Microb. Tech.*, **2005**, 37, 254 – 260; b) A. G. Watts, S. G. Withers, *Can. J. Chem.*, **2005**, 82, 1581 – 1588; c) A. Woschek, W. Lindner, F. Hammerschmidt, *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345, 1287-1298

<sup>5</sup> a) V. Gotor, *J. Biotech.*, **2002**, 96, 35 – 42; b) A. Gloge, J. Zoń, A. Kövári, L. Poppe, J. Rétey, *Chem. Euro. J.*, **2000**, 6, 3386 – 3390; c) B. Hauer, M. Breuer, K. Ditrich, M. Matuschek, M. Ress-Löschke, R. Stürmer, *Chimia*, **1999**, 53, 613 – 616; d) D. Kihumbu, T. Stillger, W. Hummel, A. Liese, *Tetrahedron Asym.*, **2002**, 13, 1069 – 1072;

<sup>6</sup> a) K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, VCH Weinheim, **2005**; b) K. Farber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin **2000**; c) K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Chemistry*, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol 1-3, Wiley VCH, Weinheim, **2002**.

Schnell haben sie auch den Einzug in industrielle Prozesse gehalten und sich inzwischen einen eigenen Zweig, die „weiße Biotechnologie“ erobert.

So wurden schon in den 1990er Jahren Enzyme für die semipräparative Synthese von  $\beta$ -Lactamen und Cephalosporinen im großen Maßstab eingesetzt<sup>7</sup> (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Vorteile der Verwendung von Enzymen bei der  $\beta$ -Lactamsynthese, gegenüber der klassischen Synthese; Sheldon et al.

Da die Synthese von Kohlenhydraten oftmals eine große Anzahl von Schutzgruppenmanipulationen benötigt, die meist einen nicht geringen Verlust von Substanz nach sich ziehen, werden zusehends häufiger chemoenzymatische Methoden in der Kohlenhydratchemie verwendet. So konnten von Fessner *et al.*<sup>8</sup> durch die Verwendung von Fructose-1,6-phosphatase in Kombination mit der Glucose-isomerase einen praktikablen Zugang zu verschiedenen L-Fucose Analoga aufzeigen, zu denen auch die fluoridierte Verbindung **9** gehört (Abbildung 2). Fucosylierte Oligosaccharide sind ein häufiger Bestandteil von Glycoproteinen<sup>9</sup> und bakteriellen Polysacchariden<sup>10</sup> und werden

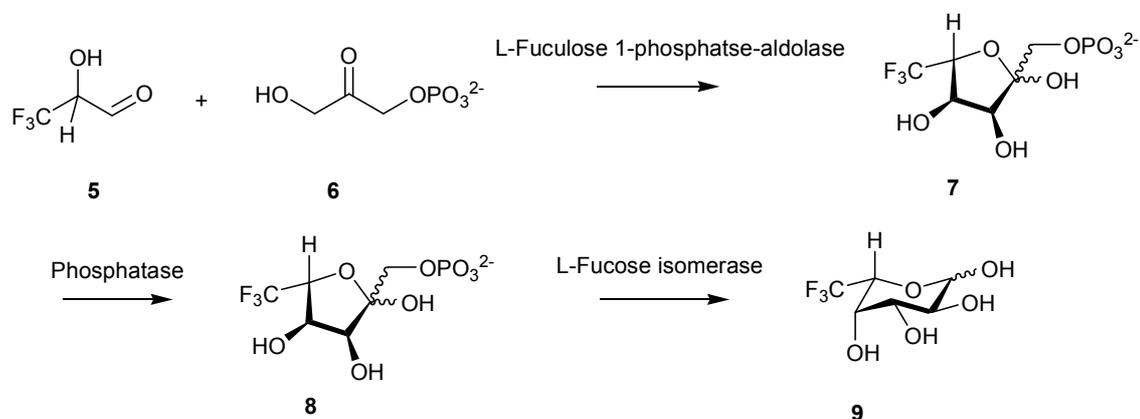
<sup>7</sup> a) M. A. Wegman, M. H. A. Janssen, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Syth. Catal.*, **2001**, 343, 559 – 576; b) V. Yang, F. Wang, F. D. Rochon, M. M. Kayser, *Can. J. Chem.*, **2005**, 83, 28- 36.

<sup>8</sup> W. - D. Fessner, C. Goße, G. Jaeschke, O. Eyrisch, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1, 125 – 132.

<sup>9</sup> R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.*, **1976**, 45, 217 – 237.

<sup>10</sup> K. Jann, B. Jann, *Surface Carbohydrates of Procarvotic Cell*, Academic Press, New York, **1977**, 247 – 287.

mit Krebserkrankungen<sup>11</sup> des Gastrointestinaltraktes in Verbindung gebracht und sind deshalb für die Krebsdiagnostik von Bedeutung.

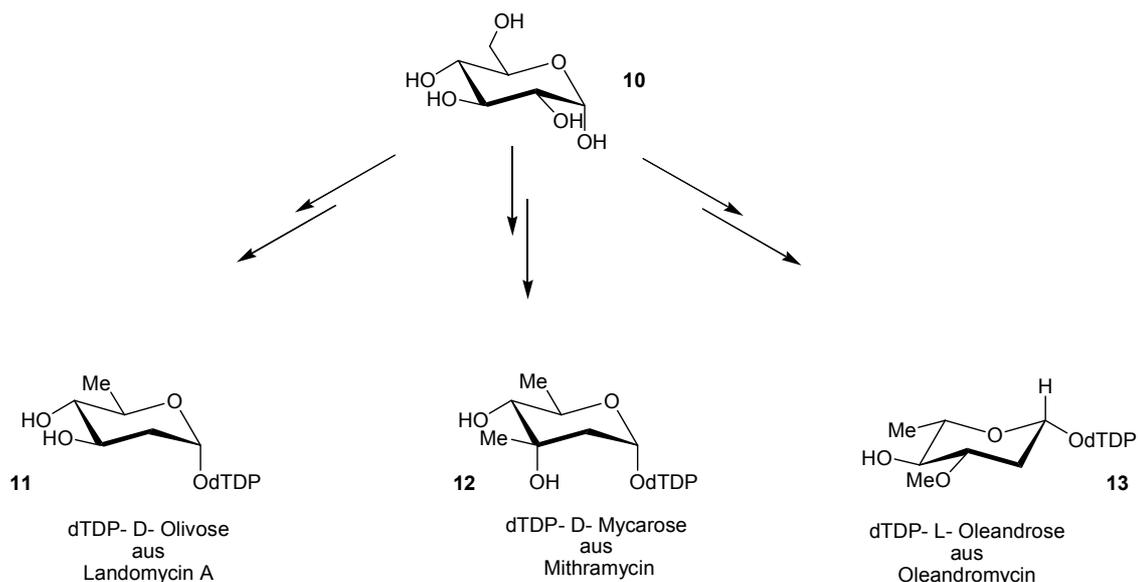


**Abbildung 2:** Chemoenzymatische Darstellung von L - Fucosederivaten mittels der L-Fucose-isomerase; Fessner et al.

Auch die Darstellung von dTDP-aktivierten 2-Desoxy- und 2,6-Didesoxyzuckern als Buildingblocks für die Polyketidbiosynthese<sup>12</sup> profitiert von der Verwendung von Isomerasen (Abbildung 3). Mit Hilfe von verschiedenen Enzymen, die hintereinander zum Einsatz kommen, werden ausgehend von  $\alpha$ -D-Glucose verschiedenste Derivate von Didesoxyzuckern dargestellt. Diese dienen bei der Biosynthese von Polyketidantibiotika als Donorsubstrate von Glycosyltransferasen.

<sup>11</sup> M. J. Blaser, G. I. Perez – Perez, H. Kleanthous, T. L. Cover, R. M. Peek, P. H. Chyou, N. Stemmermann, A. Normura, *Cancer Res.*, **1995**, 55, 2111 – 2115.

<sup>12</sup> a) S. Amman, G. Dräger, C. Rupprath, A. Kirschning, L. Elling, *Carbohydrate Res.*, **2001**, 335, 23 – 32; b) L. Elling, C. Rupprath, N. Günther, U. Römer, S. Verseck, P. Weingarten, G. Dräger, A. Kirschning, W. Pipersberg, *ChemBioChem*, **2005**, 6, 1423 – 1430.



**Abbildung 3:** dTPD-aktivierte Didesoxyzucker aus von  $\alpha$ -D-Glucose durch Einsatz verschiedener Isomerasen, Oxidoreduktasen, Transaminasen und Kettoreduktasen; Elling et al.

Die Verwendung von Isomerasen außerhalb der Kohlenhydratchemie ist noch nicht etabliert, wird aber mit zunehmender Verbesserung der technischen Voraussetzungen und damit der Handhabbarkeit von Enzymen in organischen Lösemitteln an Bedeutung zunehmen

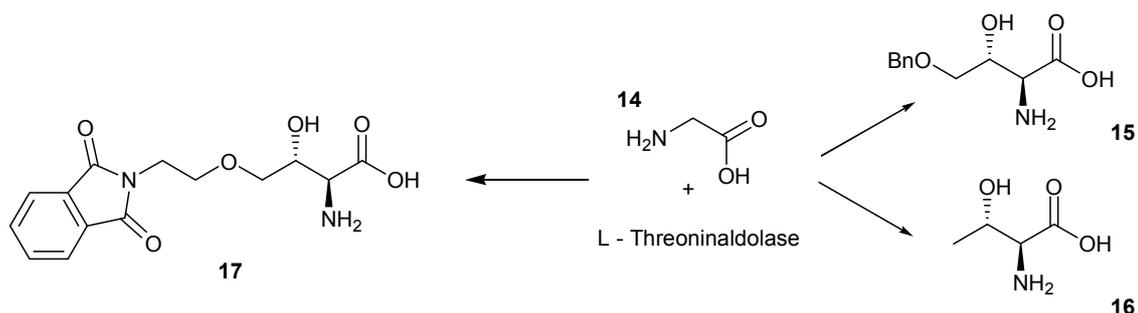
## 1.2 Lyasen / Aldolasen in der organischen Synthese

Die Verknüpfung von Kohlenstoffatomen spielt in der organischen Synthese eine besondere Rolle. Lyasen bzw. Aldolasen und Ketolasen weisen sich durch die Besonderheit aus, dass sie neue C-C-Bindungen stereoselektiv ausbilden. Dabei können sowohl zwei Aldehyde miteinander verknüpft werden, als auch ein Aldehyd und ein Keton. So können stereoselektiv  $\alpha$ -Hydroxyketone aufgebaut werden. Diese Enzyme haben zwar den Nachteil, dass sie in der Variation des Donors sehr eingeschränkt sind, dafür aber eine Vielzahl an Akzeptoren tolerieren<sup>13</sup>.

So konnten Wong *et al.* schon 1995  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren mittels der L-Threoninaldolase aus *Candida humicola* mit Glycin als Donor und den verschiedensten Aldehyden als Akzeptoren synthetisieren<sup>14</sup> (Abbildung 4).

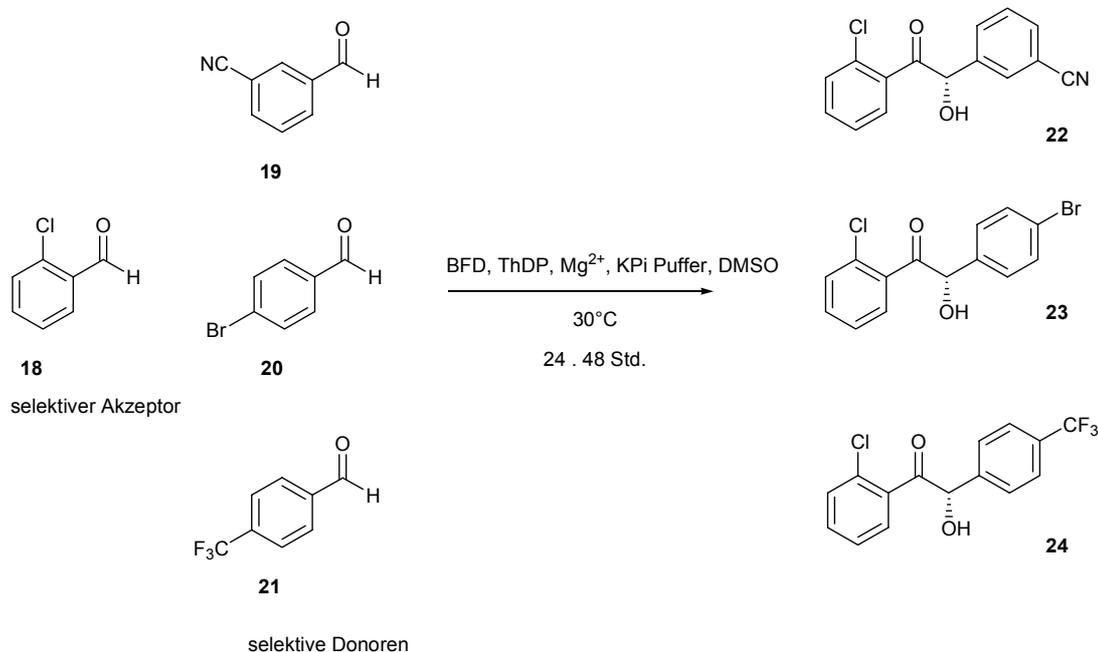
<sup>13</sup> K. M. Koeller, C. - H. Wong, *Nature*, **2001**, 409, 232 – 237.

<sup>14</sup> V. P. Vassilev, T. Uchiyama, T. Kajimoto, C. - H. Wong, *Tetrahedron Lett*, **1995**, 36, 4081 – 4984.



**Abbildung 4:** Darstellungen verschiedener  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -amino-säuren mit L-Threoninaldolase

Mittels der Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) aus *Pseudomonas putida* konnten erstmals Enzym katalysierte, asymmetrische gekreuzte Benzoinkondensationen<sup>15</sup> durchgeführt werden. Dabei konnten die Donoren variiert werden. So wurde *ortho*-Chlorbenzaldehyd (**18**) als Akzeptor mit den als Donoren dienenden substituierten Benzaldehyden **19-21** umgesetzt und dabei Benzoin **22-24** in Ausbeuten von 75 - >99% erzielt werden. Die Enantiomerenüberschüsse (ee) betragen zwischen 90% und 95% (Abbildung 5).

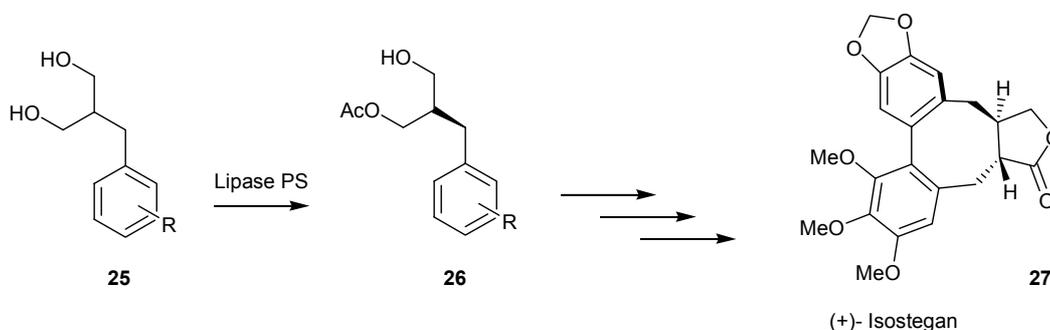


**Abbildung 1:** Kreuzbenzoinkondensation mit BFD; Müller *et al.*

<sup>15</sup> P. Dünkemann, D. Kolter – Jung, A. Nitsche, A. S. Demir, P. Siegert, B. Lingen, M. Baumann, M. Pohl, M. Müller, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12084 – 12085.

### 1.3 Lipasen in der organischen Synthese

Lipasen haben sich als Werkzeug zur Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen etabliert. Sie gehören zu den am häufigsten verwendeten Enzymen in der organischen Synthese<sup>16</sup>. So werden sie bei Racematspaltungen<sup>17</sup> genutzt, die häufig am Anfang von Naturstoffsynthesen<sup>18</sup> eine bedeutende Rolle einnehmen. Sie ermöglichen aber auch die Bildung chiraler, enantiomerenreiner Ester<sup>19</sup> zur Synthese nicht natürlicher Aminosäuren. So wurde bei der Synthese von (+)-Isostegan (**27**)<sup>20</sup> im ersten Schritt mit der Lipase PS<sup>TM</sup> das Diol **25** selektiv verestert. Der Monoester **26** fiel optisch rein in einer Ausbeute von 97% an (Abbildung 6).



**Abbildung 5:** Verwendung von Lipase bei der Synthese von (+) - Isostegan

Auch in der von Trost *et al.*<sup>21</sup> beschriebenen Synthese von (+)-Cassiol (**30**) konnte auf ein dialkyliertes Malonat zurückgegriffen werden, welches durch die Verwendung der PLE, regioselektiv hydrolysiert werden konnte (Abbildung 7). So war es möglich, die Seitenkette selektiv einzuführen.

<sup>16</sup> B. G. Davis, V. Boyer, *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 618 – 640.

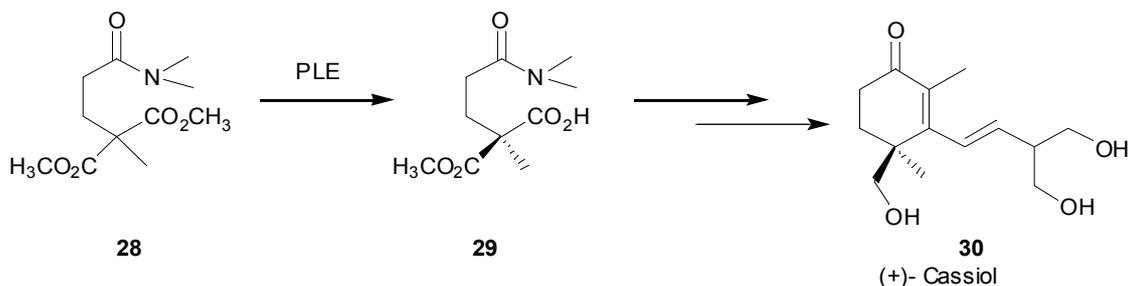
<sup>17</sup> H. v. d. Deen, A. G. Cuiper, R. P. Hof, A. v. Oeveren, B. L. Feringa, R. M. Kellogg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 3801 – 3803.

<sup>18</sup> R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 1609 – 1633.

<sup>19</sup> B. Westermann, B. Krebs, *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 189 – 191.

<sup>20</sup> T. Itoh, J.-I. Chika, Y. Takagi, S. Nishiyama, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 5717 – 5723.

<sup>21</sup> B. M. Trost, Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 6625 – 6633.



**Abbildung 6:** Verwendung von Schweineleber Esterase (PLE) für die Synthese von (+)-Cassiol von Trost *et al.*

Nicht nur am Anfang von Naturstoffsynthesen spielen regio- und stereospezifische Reaktionsführungen eine große Rolle. So konnten in der Synthese von Derivaten des Rapamycins am ungeschützten Naturstoff mittels verschiedener Lipasen an der OH-Gruppe am C-42 Veresterungen (**32**, **33**) vorgenommen werden, die sogar die Einführung von Methyl-boranat-dihydroxysäuren als Vinylester beinhalteten<sup>22</sup> (Abbildung 8). Die so aus Rapamycin dargestellte Verbindung **33** zeigt gute Aktivitäten gegen verschiedene Tumorzelllinien und befindet sich zurzeit in klinischen Studien. Enzyme erfreuen sich einer immer größer werdenden Akzeptanz in der organischen Synthese, was nicht zuletzt an den vielfältigen Möglichkeiten liegt, an komplizierte Intermediate für Naturstoffsynthesen zu gelangen.

So wurden auch semisynthetische Modifikationen z. B. in der Epothilonsynthese<sup>23</sup> erfolgreich durchgeführt.

<sup>22</sup> J. Gu, M. E. Ruppen, P. Cai, *Org. Lett.*, **2005**, *18*, 3945 – 3948.

<sup>23</sup> G. Scheid, E. Ruijter M. Konarzycka – Bessler, U. T. Bornscheuer, L. A. Wessjohann, *Tetrahedron Asym.*, **2004**, *15*, 2861 – 2869.

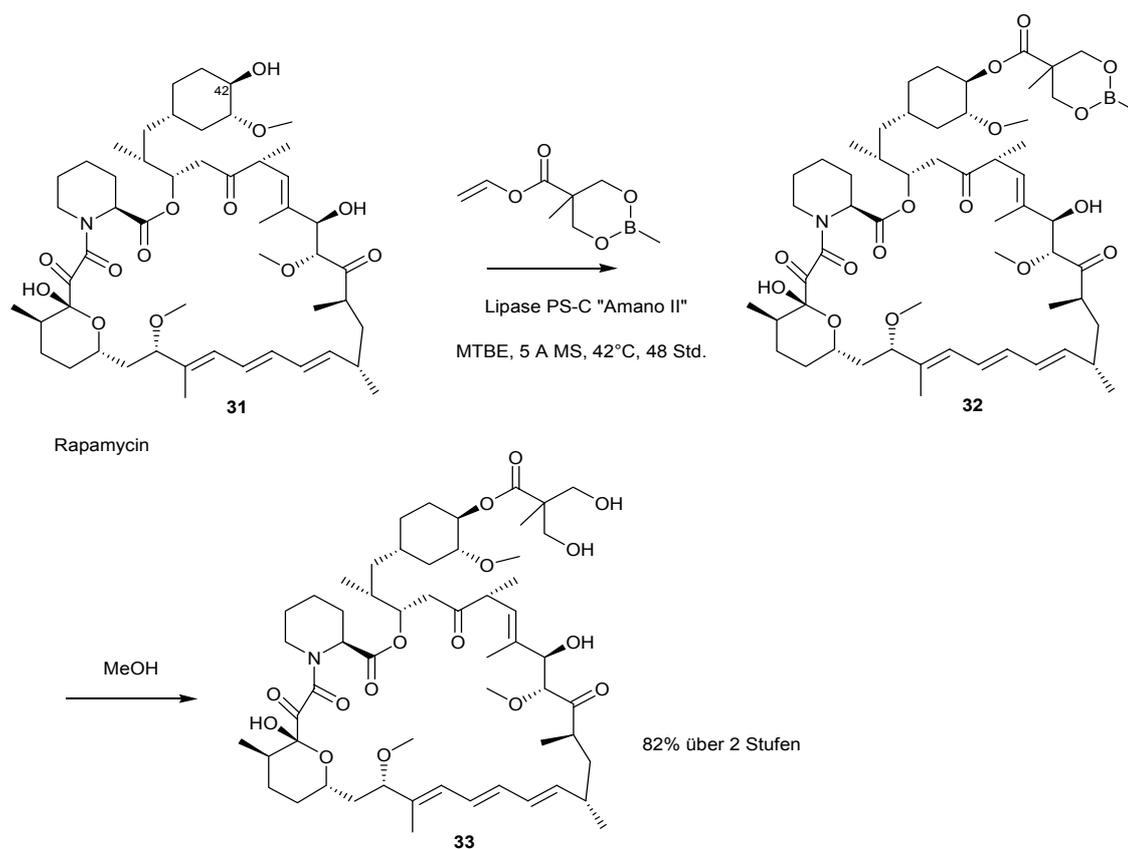


Abbildung 2: Derivatisierung von Rapamycin an C-42 mit Hilfe von Lipase PS-C

## 1.4 Enzyme in Industrieprozessen

Nicht nur bei der Synthese im kleinen Maßstab haben sich Enzyme als Katalysatoren inzwischen etabliert. Die Verbesserung der Produktionsmethoden von Enzymen, wie die Verwendung rekombinanter Enzyme aus *E. coli*<sup>24</sup>, welche um ein vielfaches günstiger zu produzieren sind,<sup>25</sup> als die entsprechenden Wildtypen, sowie die Entwicklung von Immobilisierungsstrategien, die häufig ein bis zu 30-faches Recycling der Enzymchargen ermöglichen, haben neben anderen Gründen dazu geführt, dass chemoenzymatische Prozesse für die Industrie attraktiv wurden.

Inzwischen werden in vielen der im industriellen Maßstab durchgeführten asymmetrischen

<sup>24</sup> K. Buchholz, *Med. Chem. Res.*, **2003**, *11*, 399 – 421.

<sup>25</sup> A. S. Bommarius, B. R. Riebel, *Biocatalysts*, Wiley VCH, Weinheim, **2004**.

Prozesse Enzyme verwendet<sup>26</sup>. So bringen enzymatische Umsetzungen häufig höhere Ausbeuten bei weniger Reaktionsschritten und geringerem Energieaufwand<sup>27</sup>. Enzyme werden unter anderem in der Produktion von Glucose<sup>28</sup>, Dextrose, Acrylamid, 6-Aminopenicillinsäure<sup>29</sup> (für die semisynthetische Darstellung von Penicillin- und Cephalosporin-Antibiotika<sup>30</sup>), Aspartam, Amoxicillin und Insulin eingesetzt<sup>31</sup>. Dabei kommen sowohl immobilisierte als auch freie Enzyme zum Einsatz. Bei der Produktion von Acrylamid werden auch immobilisierte Zellen eingesetzt. Einige dieser Verbindungen, bzw. die daraus dargestellten Produkte, gehören zu den Stoffen des täglichen Gebrauchs, wie z. B. Glucose oder die aus Acrylamid dargestellten Kunststoffe, die im Multitonnenmaßstab mittels Biokatalyse hergestellt werden. Nicht zuletzt profitiert das Feld der Biokatalyse von den in den letzten zwei Jahrzehnten zur Verfügung stehenden Möglichkeiten der Biotechnologie. Sie ermöglichen es, durch gezielte Screeningverfahren neue Enzyme zu entdecken und bekannte Enzyme durch gezielte Mutation auch unter nicht physiologischen Bedingungen, wie hohen Temperaturen<sup>32</sup>, ungewöhnlichen pH-Werten<sup>33</sup> und in organische Lösemitteln<sup>34</sup> einsetzen zu können. Auch die vielfältigen Verfahren zur Immobilisierung und Wiederverwendung von Enzymen, sowie die Weiterentwicklung von Reaktortechniken, werden die Einsatzmöglichkeiten von Biokatalysatoren in industriellen Prozessen noch erweitern.

---

<sup>26</sup> E. Schmidt, H. - U. Blaser, *Asymmetric Synthesis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions*, Wiley – VCH, New York, **2003**.

<sup>27</sup> R. A. Sheldon, R. Schoewart, L. M. van Langen, *Biocat. Biotransform.*, **2005**, 23, 141 – 147.

<sup>28</sup> K. Buchholz, P. B. Poulsen, *Applied Biocatalysts*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **2000**.

<sup>29</sup> A. Kallenberg, F. v. Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal*, **2005**, 347, 905 – 926.

<sup>30</sup> A. Bruggink, *Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics*, Kluwer, Dordrecht, **2001**

<sup>31</sup> T. a) Godfrey, S. West, *Industrial Enzymology*, MacMillan Press, London, **1996**; b) A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley VCH, Weinheim **2000**.

<sup>32</sup> a) W. J. Quax, N. T. Mrabet, R. G. M. Luiten, P. W. Schuurhuizen, P. Stanssens, I. Lasters, *Bio/Technol.*, **1991**, 9, 738 – 742; b) W.J. Quax, N. T. Mrabet, R. G. M. Luiten, P. W. Schuurhuizen, P. Stanssens, I. Lasters, *Nat. Biotech.*, **1991**, 9, 738 – 742.

<sup>33</sup> U. T. Bornscheuer, K. Buchholz, *Eng. Life Sci.* **2005**, 5, 309 – 323.

<sup>34</sup> N. G. Munishwar, I. Roy, *Eur. J. Biochem.*, **2004**, 271, 2575 – 2583.

## 1.5 Immobilisierung von Enzymen

Bei dem Bestreben zur Nutzung von freien Enzymen als Katalysatoren in homogenen Systemen treten häufig schwerwiegende Probleme auf. Zum einen lässt die Aktivität der verwendeten Enzyme unter den verwendeten, nicht physiologischen Reaktionsbedingungen oft schnell nach, da sie durch Prozesse wie Autooxidation, die auftretenden Scherkräfte und die durch die Lösungsmittel verursachte Denaturierung ihre katalytische Wirkung verlieren<sup>35</sup>.

Zum anderen weisen Enzyme oft nur eine geringe Toleranz gegenüber hohen Substrat- und Produktkonzentrationen auf, weshalb sie in vielen Bereichen einen zu geringen Umsatz erzielen, um in industriellem Maßstab eingesetzt zu werden. Möchte man die vorzeitige Denaturierung durch die Verwendung wässriger Medien – sofern Substrat bzw. Produkt dieses überhaupt zulassen – vermeiden, wird die ökonomische Nutzung<sup>36</sup> der Enzyme durch Reisolierung und Wiederverwendung sehr schwierig. Bei den notwendigen Aufreinigungsprozessen kann die Aktivität stark vermindert werden oder die Enzyme lassen sich nur schwer von den Substraten bzw. Produkten abtrennen. Diese Probleme können durch die Immobilisierung der verwendeten Enzyme<sup>37</sup> ganz oder zumindest teilweise umgangen werden. Immobilisierte Enzyme sind im Reaktionsmedium unlöslich und ermöglichen so eine einfache Abtrennung von Substraten und Produkten<sup>38</sup>. Sie weisen häufig eine erhöhte Toleranz gegenüber den verwendeten Reaktionsbedingungen und Lösungsmitteln, sowie eine deutlich erhöhte Stabilität<sup>39</sup> im Vergleich zu den entsprechenden Enzymen in Lösung auf. Dies setzt verschiedene, auf die jeweiligen Anwendungsgebiete angepasste, Techniken zur Enzymimmobilisierung voraus. Hierzu gibt es zwei grundsätzlich verschiedene Methoden. Eine ist die Immobilisierung durch Kupplung an Matrices. Zu dieser Methode zählen die adsorbitive, die ionische und die kovalente Bindung, sowie das Crosslinking. Die Zweite ist die Immobilisierung durch Einschluss, wozu Matrixeinhüllung und Membranabtrennung zählen.

---

<sup>35</sup> a) U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2003**, *42*, 3336-3337; b) A.M. Klivanov, *Anal. Biochem.* **1979**, *79*, 1-25.

<sup>36</sup> a) Suckling C. J, Suckling K.E. *Chem. Soc. Rev.*, **1974**, *3*, 387; b) T. Müller, H. Bahrmann, *J. Mol. Catal. Chem.* **1997**, *116*, 39 – 42.

<sup>37</sup> a) W. Tischer F. Wedekind, *Top. Curr. Chem.*, **1999**, *200*, 95; b) T. Boller, C. Meier, S. Menzler, *Org. Process Rs. Dev.* **2002**, *6*, 509 – 519; c) J. Lalonde, A. Margolin, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Vol. 2*, Wiley VCH, Weinheim, **2002**; d) R. A. Sheldon, R. Schoewart, L. M. van Langen, *Biocat. Biotransform.*, **2005**, *23*, 141 – 147.

<sup>38</sup> J. Shoa, J. Zhang, j. Nahalka, P. G. Wang, *Chem. Comm.*, **2002**, 2586 – 2587.

<sup>39</sup> A. Dyal, K. Loos, M. Noto, S. W. Chang, C. Spagnoli, K. V. P. M. Shafi, A. Ulman, M. Cowman, R. A. Goss, *J. Am Chem. Soc.*, **2003**,

### 1.5.1 Immobilisierung durch adsorbtive Bindung

Die Adsorption der Enzyme findet auf porösen Trägermaterialien mit großen Oberflächen wie Silicagelen<sup>40</sup> und Glasoberflächen<sup>41</sup> statt. Sie ist unkompliziert durchzuführen und ändert die Proteinkonformation<sup>42</sup> nur bedingt, was den Erhalt der Aktivität fördert, aber auch das Immobilisieren definierter Enzymmengen erschwert. Des Weiteren ist hier nur die Verwendung aufgereinigter Enzyme möglich, welche bedingt durch die schwache Wechselwirkung zum Trägermaterial häufig Leachingprozessen unterliegen. So konnten mit auf porösem Glas adsorbierter Lipase aus *Candida cylindracea* Racematspaltungen an  $\alpha$ -chlorierten Estern bei 60°C in Tetrachlorkohlenstoff durchgeführt werden, die zur Darstellung  $\alpha$ -chlorierter Amide dienen<sup>43</sup>.

Besonders hervorzuheben ist hierbei die Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)<sup>44</sup>, bei der Enzyme, die einen His<sub>6</sub>-tag tragen, selektiv immobilisiert werden können. Hierzu wird auf einem polymeren Träger ein Chelatlinker aufgebaut, welcher mit Ionen (meist Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> oder Cu<sup>2+</sup>) beladen wird. Der His<sub>6</sub>-tag des Enzyms wechselwirkt mit dem Ion und immobilisiert so das Enzym<sup>45</sup> gerichtet ausschließlich über den His<sub>6</sub>-tag. Die Vorteile dieser Methode sind die Reversibilität der Immobilisation und ihre Selektivität. Enzyme die keinen His<sub>6</sub>-tag tragen werden nur unspezifisch gebunden und können leicht vom Trägermaterial entfernt werden. So kann ein Trägermaterial immer wieder zur Immobilisierung der verschiedensten Enzyme verwendet werden. Diese Methode wird nahezu ausschließlich zur Aufreinigung von rekombinanten Enzymen aus Zelllysen verwendet und hat noch keinen Eingang in die Enzymprozesstechnik gefunden. Wang *et al*<sup>46</sup> berichten diesbezüglich von der Möglichkeit „synthetische Multienzymkomplexe“ (Superbeads) zur Oligosaccharidsynthese darzustellen. Sie verwenden hierzu

---

<sup>40</sup> M. Tortajada, D. Ramón, D. Beltrán, P. Amorós, *J. Mat. Chem.*, **2005**, *15*, 3859 – 3868.

<sup>41</sup> J. D. Badjic´, N. M. Kostic´, *Chem. Mater.*, **1999**, *11*, 3671 – 3679; c) D. S. Gottfried, A. Kagan, B. M. Hoffman, J. M. Friedman, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 2803 – 2807; d) Q. Chen, G. L. Kenausis, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4582 – 4585.

<sup>42</sup> R. B. Bhatia, C. J. Brinker, K. A. Gupta, A. K. Singh, *Chem. Mater*, **2000**, *12*, 2434 – 2441.

<sup>43</sup> J. D. Badjic´, E. N. Kadnikova, N. M. Kostic´, *Org. Lett.*, **2001**, *13*, 2025 – 2028;

<sup>44</sup> A. Kumar, V. Bansal, J. Andersson, P. K. Roychoudhury, B. Mattiasson, *J. Chrom. A*, **2006**, *1103*, 35 – 42; b) Porath, *J. Prot. Expr. Pur.*, **1992**, *3*, 263 – 281.

<sup>45</sup> N. Kurlermann, A. Liese, *Tetrahedron Asym.*, **2004**, *15*, 2955 – 2958.

<sup>46</sup> a) X. Chen, J. Fang, Z. Liu, J. Shao, P. Kowal, P. Adreana, P. G. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*; **2001**, *123*, 2081-2081; b) J. Nahalka, Z. Liu, X. Chen, P.G. Wang, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 372-377.

Mischungen rekombinanter Enzyme, welche mittels His<sub>6</sub>-tag an Agarosematrices immobilisiert werden. Somit können Glycosyltransferasen und Cofaktor regenerierende Enzyme nebeneinander an einer Polymermatrix immobilisiert werden und als Katalysatoren in zusammenhängenden Prozessen dienen.

### 1.5.2 Immobilisierung durch kovalente Bindung

Die irreversible Bindung von Enzymen an ihren Träger (Gläser, Polymere<sup>47</sup>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Nanopartikel<sup>48</sup>) gilt als die einfachste Methode zur Immobilisierung von Enzymen. Dabei wird eine Bindung zwischen einer Aminosäure des Enzyms und dem Trägermaterial etabliert. Die Enzyme werden oft über einen Linker (Epoxidaktivierung<sup>49</sup>, Eupergit<sup>®</sup>) kovalent mit dem Träger verbunden, was die Flexibilität der Bindung positiv beeinflusst. Das Quellen der Polymere, vor allem aber die kovalente Bindung zum Träger kann die Aktivität des Enzyms durch Konformationsänderungen negativ beeinflussen, was im schlimmsten Fall zum völligen Verlust der katalytischen Aktivität führt. Leachingprozesse treten bei dieser Art der Immobilisierung nur durch Proteolyseprozesse, nicht aber durch Scherkräfte o. ä. auf. Besonders hervorzuheben ist die Immobilisation an magnetische Nanopartikel. Hierbei können die immobilisierten Enzyme mittels Magneten aus der Reaktion entfernt werden, was langwierige Filtrationen überflüssig macht<sup>50</sup>. Eine der wichtigsten Anwendung dieser Immobilisierungsmethode ist die Penicillinspaltung (Abbildung 1), bei der das Enzym Penicillinacylase auf einer Eupergit<sup>®</sup>-Polymermatrix gebunden ist<sup>51</sup> (Abbildung 9)

---

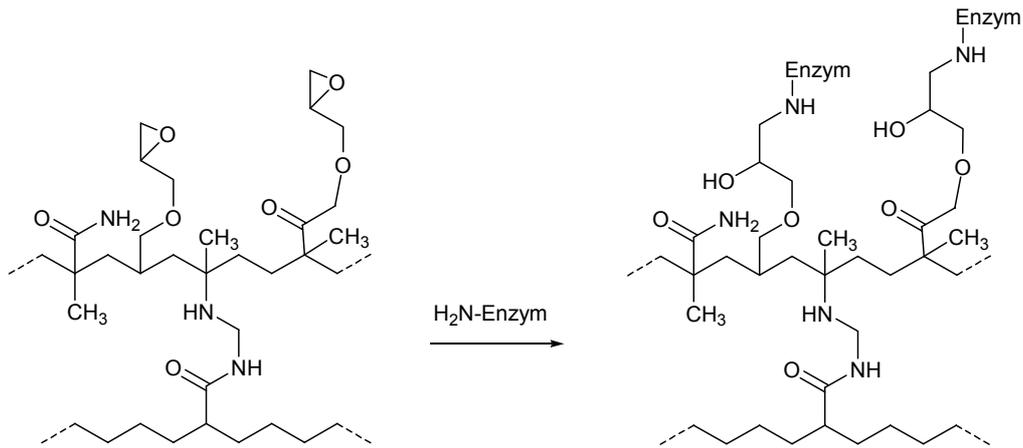
<sup>47</sup> F. Şahin, G. Demirel, H. Tümtürk, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2005**, 37, 148 – 153.

<sup>48</sup> H. M. R. Gardimalla, D. Mandal, P. D. Stevens, M. Yen, Y. Gao, Y., *Chem. Comm.*, **2005**, 35, 4432 – 4434.

<sup>49</sup> a) E. Calleri, G. Massolini, D. Lubda, C. Temporini, F. Liodice, G. Caccialanza, *J. Chrom. A*, **2004**, 1031, 93 – 100; b) C. Mateo, R. Torres, G. Fernández-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, A. Hidalgo, F. López-Gallego, R. Fernández-Lafuente, *Biomacromol.*, **2003**, 4, 772 – 777.

<sup>50</sup> a) J. S. Son, J. Reichel, B. He, M. Schuchman, S. B. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 7316-7317; b) E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 6042 – 6108.

<sup>51</sup> D. M. Krämer, *Jahrbuch Biotechnologie*, Hanser Verlag, München, **1986**, 398 – 413.



**Abbildung 9:** Kovalente Bindung eines Enzyms an die Eupergitmatrix

### 1.5.3 Immobilisierung durch Matriceinhüllung

Enzyme können in verschiedene Matrices, Gele<sup>52</sup> oder Polymere<sup>53</sup>, z. B. Acrylamidgele eingeschlossen werden. Die Matrices müssen für Edukte und Produkte durchlässig sein, die Enzyme aber auf ein Gebiet beschränken, aus welchem sie nicht herausgewaschen werden, in dem sie aber dennoch katalytisch aktiv bleiben. Da Enzyme sich bei Polymerisationen nicht inert verhalten, werden bei diesem Verfahren auch kovalente Bindungen ausgebildet, die wieder zu einer verminderten Aktivität des Enzyms führen können. Auch die Matrix muss entsorgt werden, wenn das Enzym nicht mehr aktiv ist.

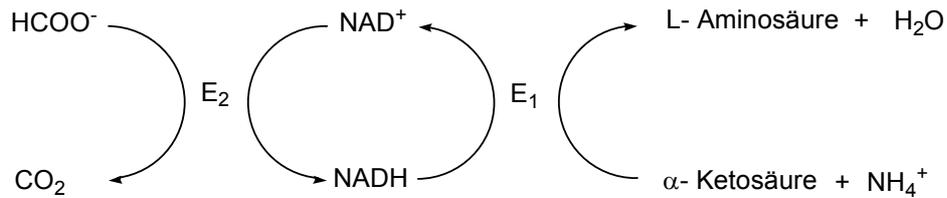
### 1.5.4 Immobilisierung durch Membranabtrennung

Mittels semipermeabler Membranen können Enzyme im Reaktor zurückgehalten werden, sie sind so quasi immobilisiert. Entsprechende Membranen für die Ultrafiltration haben Ausschlussgrenzen von 5000 bzw. 10000 Dalton und sind dementsprechend undurchlässig für Moleküle mit höherer Masse.

<sup>52</sup> a) M. T. Reetz, P. Tielmann, W. Wiesenhöfer, W. Könen, A. Zonta, *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, *345*, 717 – 728; b) D. S. Wentworth, D. Skonberg, D. W. Donahue, A. Ghanem, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2004**, *91*, 1294 – 1299;

<sup>53</sup> a) Y. Moskovitz, S. Srebnik, *Biophys. J.*, **2005**, *89*, 22 – 31; b) C. Lei, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 11242 – 11243;

Hierbei besteht die Möglichkeit, Coenzym-abhängige<sup>54</sup> Reaktionen in diesen Systemen durchführen zu können. Die Schwierigkeit hierbei ist aber, auch den niedermolekularen Cofaktor z.B. NADH im Reaktor zu halten, da die Membran für diesen durchlässig ist. Das Problem konnte durch die Anbindung des Cofaktors an Polyethyenglycol als lösliches Polymerkonjugat<sup>55</sup> gelöst werden. Mittels dieser Technik werden L-Aminosäuren aus  $\alpha$ -Ketosäuren dargestellt (Abbildung 10).



E<sub>1</sub> = Formiatdehydrogenase

E<sub>2</sub> = Dehydrogenase (entsprechend der Aminosäure die dargestellt wird)

**Abbildung 10:** Reaktionsschema der kontinuierlichen Gewinnung von L-Aminosäuren aus  $\alpha$ -Ketosäuren und Polymer-gebundenem Coenzym

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass für jede neue Anwendung von Enzymen die entsprechende Immobilisierungsmethode angepasst werden muss. Diese muss einen Kompromiss zwischen den Vorteilen der Immobilisierung der Enzyme und den möglichen Verlusten der Katalyseaktivität bilden. Zukünftig sollten Informationen zu Proteinsequenzen, 3D-Strukturen und Reaktionsmechanismen chemoenzymatischer Umsetzungen verstärkt mit den Eigenschaften des Trägermaterials verknüpft werden, um zu gerichteten Immobilisierungsstrategien (siehe Kapitel 1.6.1) zu gelangen<sup>56</sup>, welche ein Maximum an Umsatz und Wiederverwendbarkeit ermöglichen.

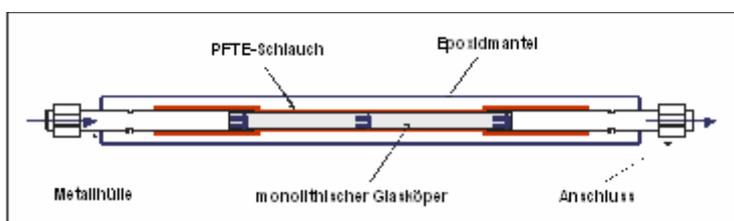
<sup>54</sup> a) R. Mertens, C. Wandrey, A. Liese, *Chem. Ing. Tech.*, **2005**, 77, 609 – 616.; b) M.-R. Kula, C. Wandrey, *Methods in Enzymology*, Vo. 136, 9 – 21, **1987**.

<sup>55</sup> Riva, C. Carrera, F. M. Veronese, A. F. Brückmann, *Enzyme Microb. Technol.*, **1986**, 8, 556-557.

<sup>56</sup> U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 3336 – 3337.

## 1.6 PASSflow-Technik

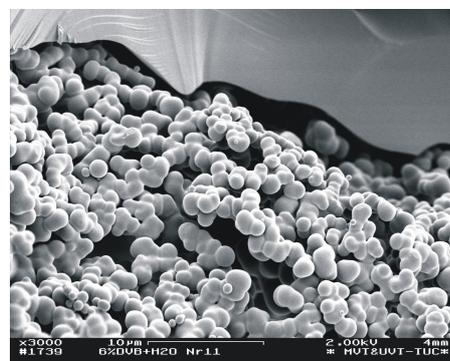
Die Einführung der Durchflusstechnik in der Festphasen-unterstützten organischen Synthese benötigt spezielle, für diesen Zweck geeignete Mikroreaktoren. Diese Durchflussreaktoren ermöglichen Synthesen in Lösung ohne die Notwendigkeit von Aufarbeitungsschritten wie Extraktion oder Filtration. Diese Anforderungen werden durch die Mikroreaktoren der PASSflow-Technik<sup>57</sup>, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurden, erfüllt. Diese Mikroreaktoren bestehen aus ummantelten monolithischen Säulen aus einem porösen Glas/Polymer-Kompositmaterial, welches aus ca. 1 µm großen Polymerkügelchen, die in der Glasmatrix polymerisiert sind, besteht. (Abbildungen 11 – 13).



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung eines PASSflow-Reaktors



**Abbildung 13:** Bild einer ummantelten PASSflow-Säule



**Abbildung 12:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Polymer/Glas-Komposits im Inneren des PASSflow-Reaktors.

Diese ermöglicht das Quellen des Polymers in den Grenzen der Glasmatrix, ohne dass es zu „Bypass-Effekten“ kommt oder der Lösungsmittelfluss blockiert wird. Die im Inneren befindlichen Polymere bestehen überwiegend aus mit Divinylbenzol quervernetztem Polystyrol, welches aber wie in dieser Arbeit beschrieben noch weitere monomere Bausteine wie Vinylpyrrolidinon beinhalten kann. Die Reaktanden werden in einem kontinuierlichen Fluss durch das Mikrokanalsystem des Glas/Polymer-Komposits gepumpt. Hierzu können handelsübliche HPLC-Pumpen verwendet werden. Bei der Reaktionsführung stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung.

Die Reaktionslösung wird ein Mal durch die PASSflow-Säule gepumpt und ist dann idealerweise vollständig umgesetzt (single pass), oder wird im Kreislauf immer wieder durch die Säule gepumpt, bis die Reaktion vollständig abgelaufen ist (batch mode). Durch die Verwendung von computergesteuerten HPLC-Pumpen lässt sich der Syntheseprozess

<sup>57</sup> A. Kirschning, C. Altwicker, G. Dräger, J. Harders, N. Hoffmann, U. Hoffmann, H. Schönfeld, W. Solodenko, U. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3995-3998.

von der Beladung des Polymers bis zur Aufarbeitung automatisieren (Abbildung 14).

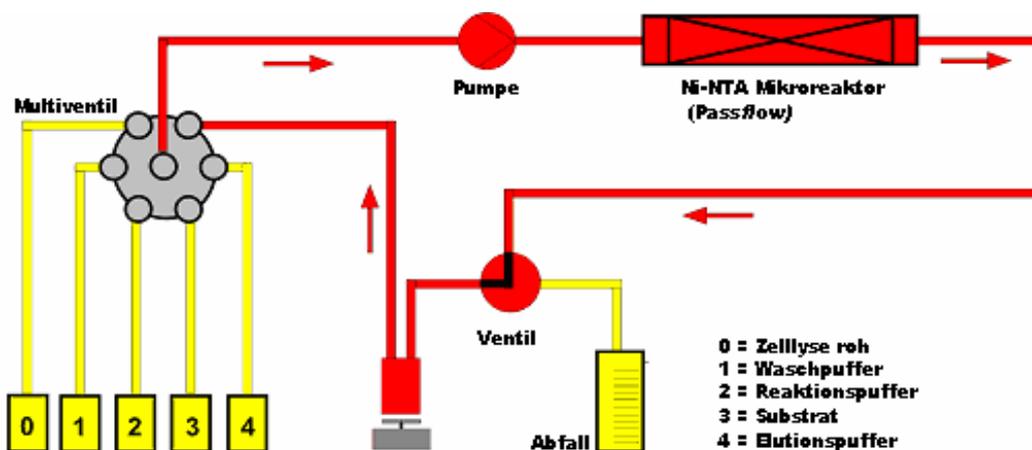


Abbildung 14: Risszeichnung einer PASSflow-Apparatur, mit Pumpschema

Die Polymere im Inneren des Reaktors können mit den unterschiedlichsten Reaktanden beladen werden. Dabei können Substitutionen, Reduktionen, Oxidationen<sup>55,58</sup>, HWE-Olefinierungen, Transferhydrierungen, Palladiumkatalysierte Kreuzkupplungsreaktionen (Suzuki-Reaktionen, Heck-Reaktionen) und asymmetrische Hydrierungen<sup>59</sup> durchgeführt werden. Die Reversibilität der Beladung spielt hierbei eine große Rolle, bei den stöchiometrisch eingesetzten Substanzen ebenso wie bei den immobilisierten Katalysatoren. Das System ist nur von hohem ökonomischem Wert, wenn nicht nach dem Verbrauch der Additive bzw. Katalysatoren der Reaktor entsorgt werden muss, sondern wiederbeladen werden kann und so praktisch unbegrenzt nutzbar ist.

Anwendungen der PASSflow-Technik für Umsetzungen von Substraten mit Enzymen, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt werden, bieten die erfolgversprechendsten Aussichten zur Realisierung von Mehrstufenreaktionen. Die Möglichkeit alle hintereinander folgenden Umsetzungen in ein und demselben Lösungsmittel (z. B. Phosphatpuffer) ohne Aufarbeitung, durchzuführen, welches bei vielen chemischen Umsetzungen den limitierenden Faktor darstellt, steht dieser Anwendung offen.

<sup>58</sup> a) G. Sourkouni- Argirusi, A. Kirschning, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 3781 – 3784; b) M. Brünjes, G. Sourkouni- Argirusi, A. Kirschning, *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345, 635 – 642.

<sup>59</sup> W. Solodenko, G. Jas, U. Kunz, A. Kirschning, unveröffentlichte Ergebnisse.

## 2. Zielsetzung

### 2.1 Entwicklung einer simultanen Aufreinigungs- und reversiblen Immobilisierungsstrategie auf Basis von IMAC

Die IMAC ist die Aufreinigungsmethode rekombinanter Enzyme. Sie wird in der Isolierung von heterolog exprimierten Enzymen und Proteinen verwendet. Hierbei wird die Gensequenz zum Aufbau des Proteins so verändert, dass bei der Proteinbiosynthese an das C- oder N-terminale Ende des Enzyms ein His<sub>6</sub>-tag<sup>60</sup> synthetisiert wird. Mit Hilfe dieses His<sub>6</sub>-tags ist es möglich, über die Affinität von zweiwertigen Ionen dieses Genveränderte rekombinante Enzym aus der Zellyse selektiv zu komplexieren<sup>61</sup>. Die Möglichkeit, diesen Ionen-Enzym-Komplex für Biotransformationen zu nutzen, ist Aufgabe in dieser Arbeit.

### 2.2 Darstellung eines neuen NTA<sup>62</sup>-Systems

Die vielfach verwendeten Ni-NTA-Systeme beruhen alle auf der Aminosäure Lysin und deren Derivaten. Sowohl die Darstellung der verschiedenen Lysin-basierten Chelatlinker als auch die Linker selbst, sind patentrechtlich<sup>63</sup> geschützt. Zwar sind sie kommerziell erhältlich (Firma Qiagen), aber das polymere Rückgrat liegt dadurch irreversibel fest. Zumeist besteht es aus Agarose, die sich nicht zwangsläufig inert verhält und nicht problemlos in das für diese Arbeit vorgesehen Reaktorsystem integriert werden kann.

Es sollte nun ein neues, auf der Aminosäure Tyrosin basierendes NTA-System entwickelt werden, welches auf einer eigens dafür entwickelten mechanisch und chemisch stabilen polymeren Matrix aufgebracht sein sollte. Dieses System sollte mit Hilfe der Benzaldehydlyase im Detail untersucht werden.

---

60 Sequenz aus sechs hintereinander folgenden Histidinmolekülen

61 <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/INT/ProteinExpression.aspx>: The QIAexpressionist (PDF), 2003.

62 NTA: Nitrilotriacetatkomplex

63 a) H. Höbeli, E. Hochuli, Metal chelating resins, EU Pat, 1988, EP 0253303 A1.

### 2.3 Vergleich des neuen NTA – Systems mit dem etablierten Lysinsystem

Die Leistungsfähigkeit, d. h. die Kapazität und Selektivität des neuen NTA-Linkers, soll mit dem Lysin-basierten Linker verglichen werden. Dazu wird der neu entwickelte Tyrosinlinker auf die zu Verfügung stehenden Polymere aufgebracht und dasjenige Polymer, welches die optimalen Eigenschaften hat, wird bestimmt. Der Lysin-basierte Linker wird ebenfalls an dieses Polymer gekuppelt um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Systeme zu gewährleisten.

### 2.4 Biotransformationen mit dem neuen NTA – System und Vergleich mit dem etablierten Lysinsystem

Des Weiteren sollte die Technologie etabliert werden, mit dem immobilisierten Enzym ohne Elution und weitere Aufreinigung chemoenzymatische Transformationen an der festen Phase durchzuführen. Es wird vermutet, dass die polymere Umgebung einen Schutz des Enzyms vor Denaturierung im Kontakt mit organischen Lösemitteln darstellt. Die Transformation soll sowohl für das schon bekannte Lysin-basierte Linkersystem als auch für den neu entwickelten NTA-Anker geprüft werden. Wiederum soll hierbei die Benzaldehydlyase, ein sehr gut untersuchtes<sup>64</sup> und detailliert verstandenes Enzym, als Testsystem dienen. Schließlich soll die Acyloinkondensation aromatischer Aldehyde zu  $\alpha$ -Hydroxyketonen im *PASSflow*-Reaktor realisiert werden. Auch sollen chemoenzymatische Umsetzungen mit verschiedenen Lipasen an Polyolen im *PASSflow*-Reaktor durchgeführt werden, um die Vielseitigkeit der verwendbaren Enzyme und Umsetzungsmöglichkeiten zu prüfen und die Reversibilität der Immobilisation zu verifizieren (Abbildung 15).

---

<sup>64</sup> a) E. Janzen, *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2002**; b) P.D. De María, T. Stillger, M. Pohl, S. Wallert, K. Drauz, H. Gröger, H. Trauthwein, A. Liese, *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*, **2006**, *38*, 43-47; c) T. G. Mosbacher, M. Mueller, G. E. Schulz, *FEBS Journal*, **2005**, *272*, 6067-6076; d) M. M. Kneen, I. D. Pogozeva, G. L. Kenyon, M. J. McLeish, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2005**, *1753*, 263-271, e) T. Hischer, D. Gocke, M. Fernández, P. Hoyos, A. R. Alcántara, J. V. Sinisterra, W. Hartmeier, M. B. Ansorge-Schumacher, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 7378-7383; f) A. S. Demir, Ö. Şeşenoglu, E. Eren, B. Hosrik, M. Pohl, E. Janzen, D. Kolter, M. Müller, *Advanced Synth. Catal.*, **2002**, *344*, 96-103

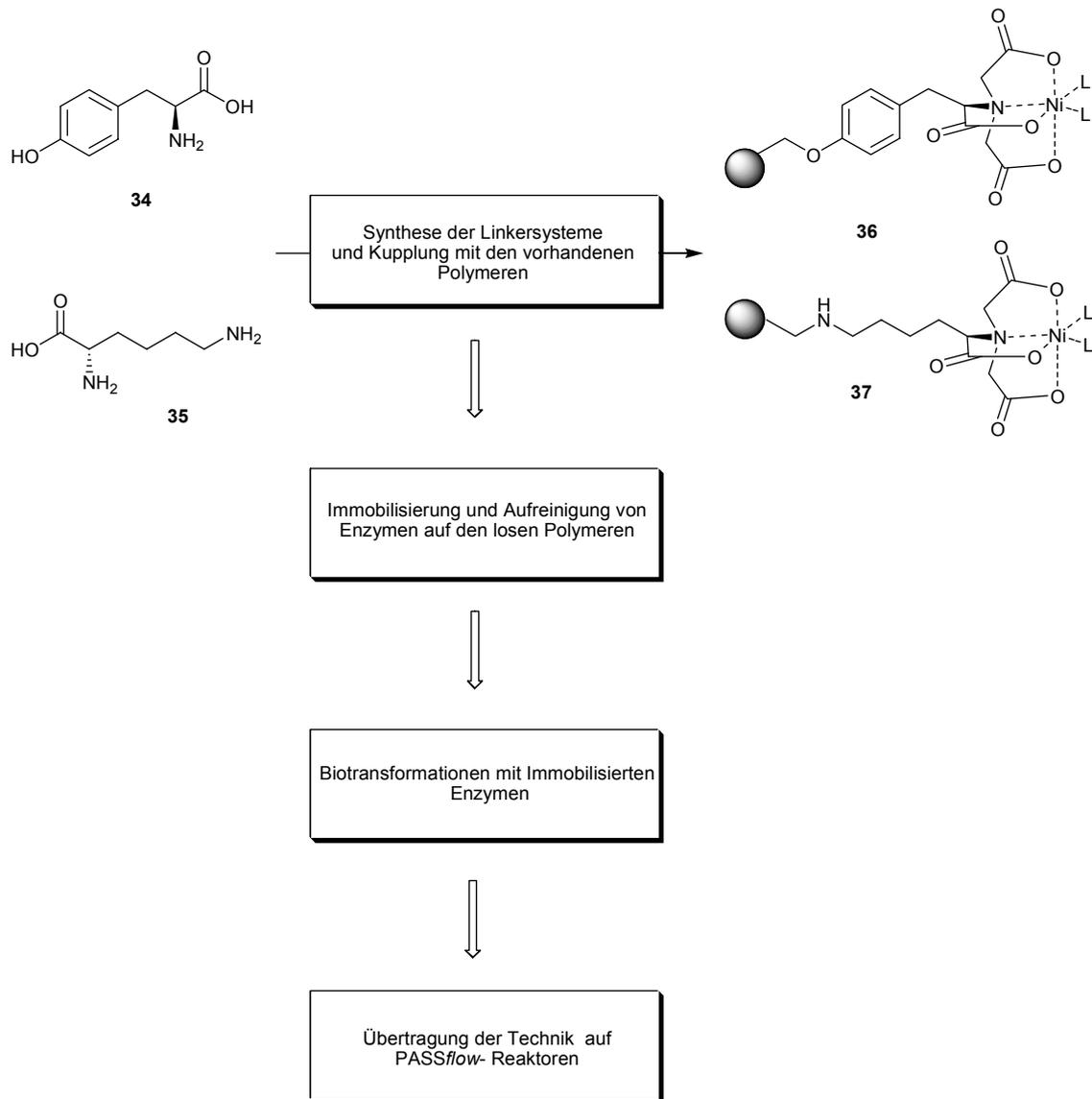
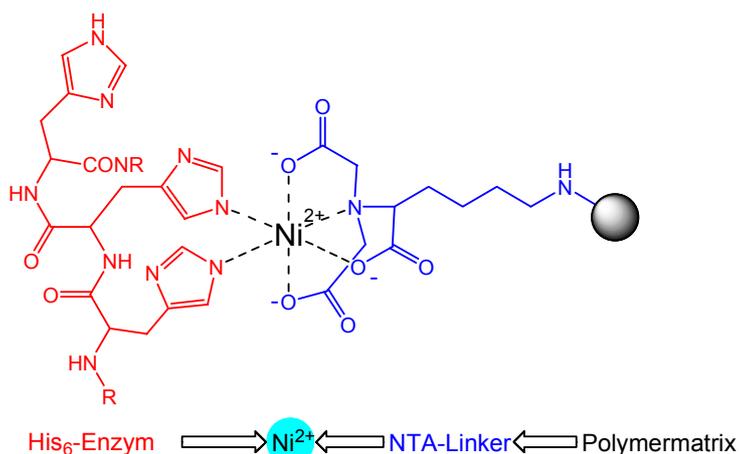


Abbildung 15

### 3 Entwicklung des Chelatlinkersystems

#### 3.1 Synthese der IMAC Bausteine

Bei der „Immobilized metal ion affinity chromatography“ (IMAC) handelt es sich um eine reversible Immobilisierungsmethode für Enzyme<sup>65</sup>, phosphorylierte Proteine<sup>66</sup>, Peptide<sup>67</sup>, und Nukleinsäuren<sup>68</sup>, die hauptsächlich zur Aufreinigung (im Fall der phosphorylierten Proteine zum fishing)<sup>69</sup> Verwendung findet, wobei in industriellen Maßstäben<sup>70</sup> gearbeitet werden kann. Sie wurde 1975 von Porath et al.<sup>71</sup> eingeführt und beruht auf der Affinität von verschiedenen zweiwertigen Ionen zu Elektronenpaardonoren – meist Stickstoffatome und Carboxylate. Für die meisten Enzymanwendungen dienen Ni<sup>2+</sup>-Ionen als „Immobilisator“, es werden aber auch Zn<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> verwendet<sup>72</sup>. Bei der Immobilisierung von phosphorylierten Proteinen finden auch Ga<sup>2+</sup>-Ionen Anwendung.



**Abbildung 16:** Wechselwirkung des Metallchelats mit dem His<sub>6</sub>-tag eines Enzyms

<sup>65</sup> T. Mayor, R. J. Deshaies, *Methods in Enzymology*, **2005**, 399, 385 – 392.

<sup>66</sup> M. Zeller, S. König, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**, 387, 890 – 909.

<sup>67</sup> P. Hansen, G. Lindeberg, L. Andersson, *J. Chrom.*, **1992**, 627, 125 – 135.

<sup>68</sup> P. Hubert, J. Porath, *J. Chrom.*, **1980**, 198, 247 – 255.

<sup>69</sup> M. Trost, D. Wehmhöner, U. Kärst, G. Dieterich, J. Wehland, L.; Jansch, *Proteomics*, **2005**; 5,1544-1557; b) Corthals, G.L., Aebersold, R., Goodlett, D.R., *Met. Enzym.*, **2006**, 405, 66 – 81.

<sup>70</sup> V. Gaberc-Porekar, V. Menart, *Chem. Eng. and Tech.*, **2005**, 28, 1306 – 1314.

<sup>71</sup> J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature*, **1975**, 258, 598 – 599.

<sup>72</sup> L. Schmitt, C. Dietrich, R. Tampé, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 8485 – 8491.

Um die Enzyme, Proteine oder Peptide immobilisieren zu können, müssen diese vorher gentechnisch mit einem His<sub>6</sub>-tag fusioniert werden<sup>73</sup>. Dabei handelt es sich um die Abfolge von sechs Histidinmolekülen, die peptidisch miteinander verknüpft sind. Diese Sequenz kommt in nativen Proteinen nicht vor und weist eine hohe Affinität zu den Metallchelaten auf (Abbildung 16). Zur Immobilisierung wird das Gen für das Protein zusammen mit dem genetischen Code für den His<sub>6</sub>-tag, der entweder anstelle des Start- oder Stoppcodons eingeführt wird, mittels eines geeigneten Plasmids in ein anderes Bakterium (*E. coli*)<sup>74</sup>, transformiert. Dieser produziert dann das Protein, induziert durch einen Initiator (meist IPTG)<sup>75</sup>. Die Bakterienzellen werden lysiert, das gewünschte Protein wird zusammen mit allen anderen in der Zelle befindlichen löslichen Bestandteilen freigesetzt und kann aus der Zellyse immobilisiert und aufgereinigt werden. Um die Ni<sup>2+</sup>-Ionen für die Immobilisierung nutzen zu können, müssen diese auf eine Matrix aufgebracht sein. Diese Matrix besteht aus einem inerten Rückgrat und einem kovalent gebundenen Chelatliganden, der die entsprechenden Ionen komplexiert, welche dann mit dem His<sub>6</sub>-tag in Wechselwirkung treten können. Hierbei dienen zwei Ligandensysteme zur Chelatisierung. Das früher entwickelte ITA-Linkersystem, welches auf Aminen basiert und bei dem nur zwei chelatisierende Reste am Linker vorhanden sind und das hier verwendete NTA-System, bei dem drei komplexierende Reste mit dem Metallion wechselwirken. Das NTA-System hat den Vorteil, dass das verwendete Metallion fest am Linker gebunden ist und es kaum zum Leaching des Ions kommt. Die Immobilisierung von Enzymen kann mit dem NTA-Linkersystem deutlich besser realisiert werden. Im Folgenden werden die Synthesen der verschiedenen verwendeten Chelatlinker und der Polymermatrices beschrieben.

#### 3.1.1 Synthese des Lysinlinkers

Die von Hochuli 1990 publizierte mehrstufige Synthese zur Transformation von Lysin zum NTA-Liganden<sup>76</sup> zeigt, dass Aminosäuren einen praktikablen Zugang für die Darstellung von metallchelatisierenden Linkersystemen bieten. Der erste Schritt der Synthese

---

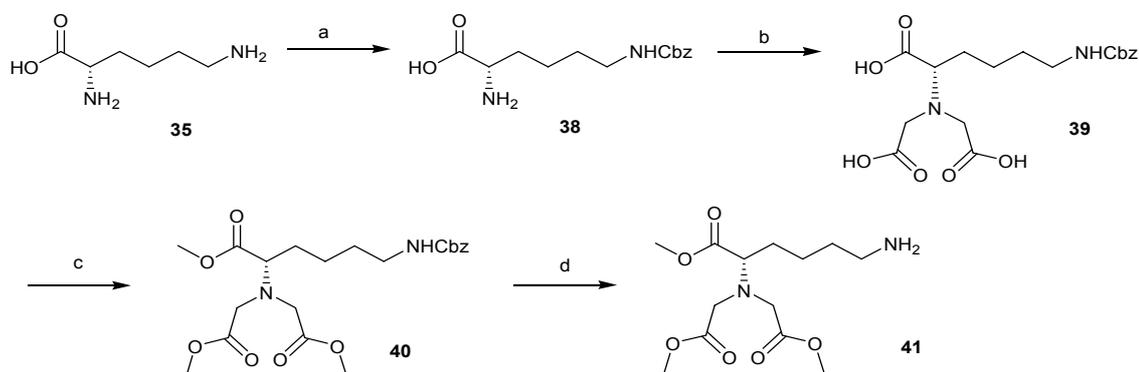
<sup>73</sup> J. J. Winzerling, P. Berna, J. Porath, *J. Methods*, **1992**, 4, 14 – 25.

<sup>74</sup> F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dumm, J. W. Dubendorff, *Meth. Enzymol.* **1990**, 185, 60 - 89.

<sup>75</sup> Y.-P. Weng, F.-C. Hsu, W.-S. Yang, H.-P. Chen, *Enzyme And Microb. Tech.* **2006**, 38, 465 - 469.

<sup>76</sup> E. Hochuli, *Gen. Engin.* **1990**, 12, 87 – 98.

beinhaltete die Komplexierung des C- und N-Terminus mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen um die anschließende Schützung der Aminofunktion in der Seitenkette des Lysins (Schema 1) mit Benzyloxycarbonylchlorid nicht zu stören. Durch Zugabe von Salzsäure wurde das Carbamat **38** kupferfrei in 77% Ausbeute als Hydrochlorid ausgefällt, wobei weitere Aufreinigungsschritte entfielen. Die anschließende Alkylierung am N-Terminus wurde mit Bromessigsäure und NaOH bei  $0^\circ\text{C}$  durchgeführt. Das trialkylierte Amin **39** wurde wiederum durch Zugabe von Salzsäure ausgefällt. Nach Umkristallisation aus Wasser wurden die Säurefunktionen nach Fischer<sup>77</sup> verestert (**40**) und die Aminofunktion der Seitenkette mittels Pd/C und  $\text{H}_2$  freigesetzt (**41**).



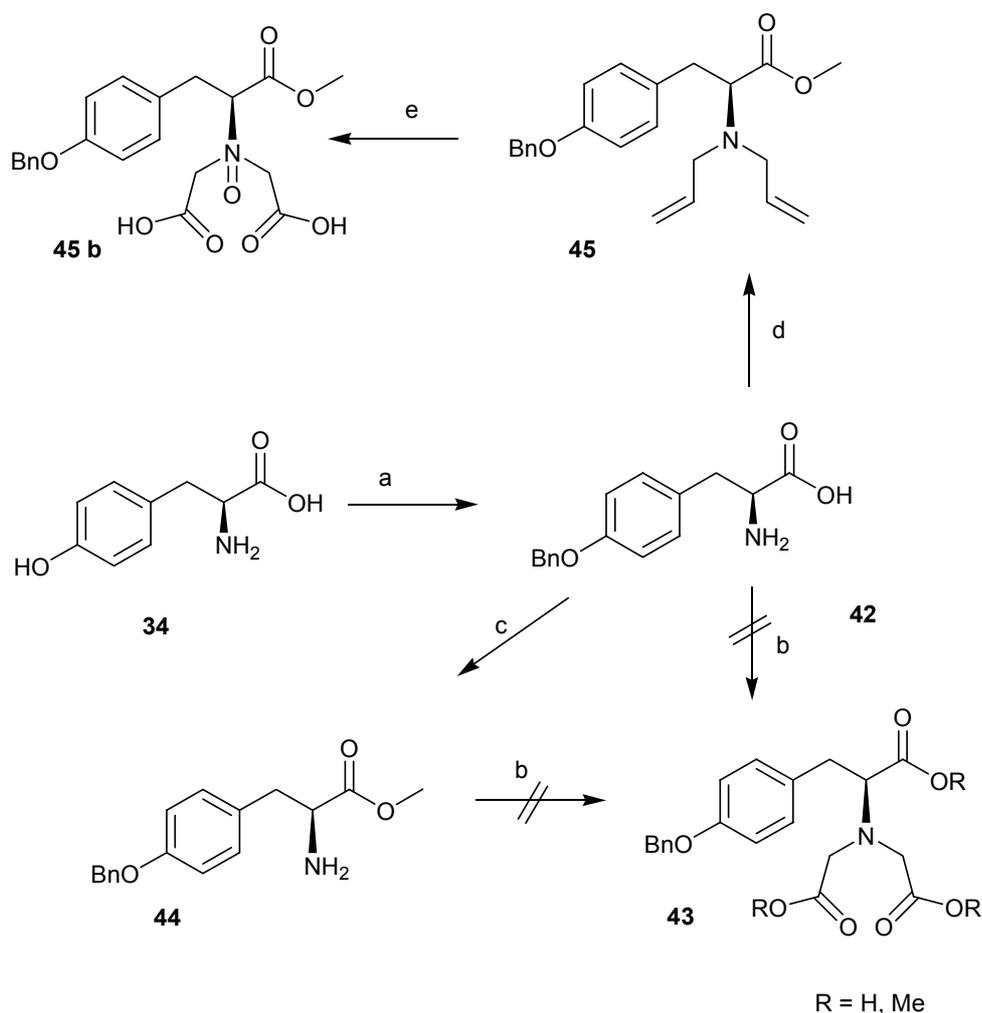
**Schema 1:** Reagenzien und Bedingungen: a) NaOH,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, Cbz-Cl, (77%); b) NaOH, Bromoessigsäure, (87%); c) MeOH,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; d) Pd/C,  $\text{H}_2$ , MeOH (98% über zwei Stufen).

### 3.1.2 Synthese des Tyrosinlinkers

Da alle Chelatlinker, die auf Lysin oder Lysinderivaten beruhen, patentgeschützt sind und sich andere Aminosäuren ebenfalls zum Aufbau von Chelatliganden eignen sollten wurde hier die Entwicklung eines Tyrosin-basierten Chelatlinkers angestrebt. Dabei fiel die Wahl auf Tyrosin, da es sich um ein günstiges Substrat handelt, welches nicht zu viel Komplexität besitzt. Es besitzt eine geeignete Bindungsstelle zum Polymer und weckt die Erwartung, dass es sich als aromatische Aminosäure gut in das aus Aromaten bestehende polymere Umfeld einfügt. Analog zur Synthese des Lysinlinkers wurde hier die Funktionalität in der Seitenkette des Tyrosins Benzyl-geschützt. Hierzu wurden der C-

<sup>77</sup> a) E. Fischer, B. Oetker, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1913**, *46*, 4029 – 4040; b) H. Sharghi, M. Hosseini Sarvari, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3627-3633.

und *N*-Terminus mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen komplexiert um ausschließlich die phenolische Hydroxygruppe mit Benzylchlorid verethern zu können.



**Schema 2:** Reagenzien und Bedingungen: a) NaOH,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, Bn-Cl (64%); b) siehe Tabelle 1; c)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , MeOH; d) Allylbromid,  $\text{NEt}_3$ , Toluol; e)  $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

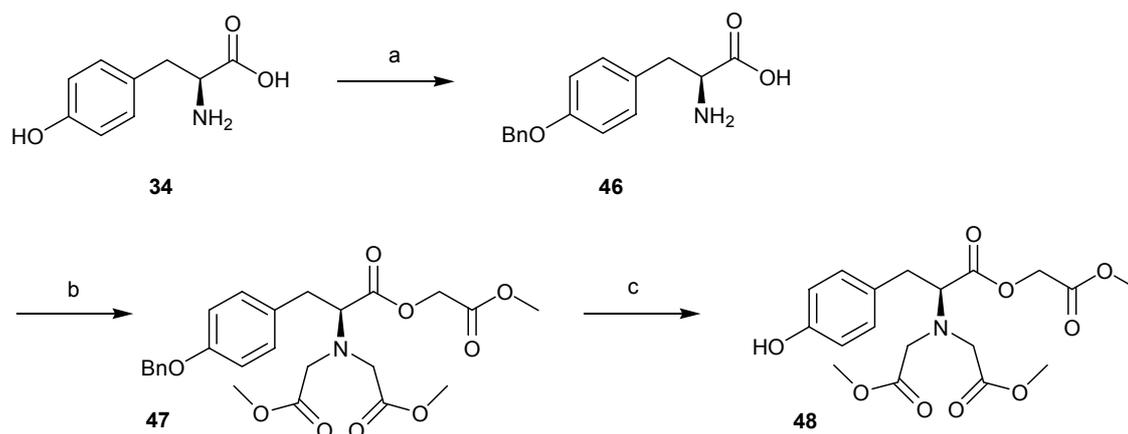
Der Ether **42** wurde durch Zugabe von Salzsäure in 64% Ausbeute kupferfrei ausgefällt. Analog zur Synthese des Lysinlinkers sollte nun die Alkylierung der Aminofunktion mit Bromessigsäure und NaOH durchgeführt werden (Schema 2). Hierbei konnte nur das am Stickstoff monoalkylierte Produkt isoliert werden. Auch Variationen der Reaktionsbedingungen, Alkylierungsmittel und der Basen brachten keinen reproduzierbaren Erfolg, wie aus Tabelle 1 (Einträge 1-9) ersichtlich ist. Die Synthese des Methylesters sollte zum Erfolg führen, da dieser deutlich unpolarer ist, eine bessere Löslichkeit in organischen Lösemitteln aufweist und eventuell auftretende Polymerisationen während der Reaktion verhindert. Dennoch blieben die

Alkylierungsversuche, erfolglos. Es konnte hier entweder kein Umsatz oder nur das am Stickstoff monoalkylierte Produkt beobachtet werden. Auch die Dialkylierung des Stickstoffs mit Allylbromid und die anschließende Ozonolyse führten nicht zu dem gewünschten Erfolg. Erst die Verwendung von  $K_2CO_3$  und Bromessigsäuremethylester sowie der Zusatz von TBAI führten letztlich zum gewünschten Ergebnis Tabelle 1 (Einträge 10 und 11 und Schema 3).

Substrat	Alkylierungsmittel	Base	Temperatur	Lösemittel	Alkylierung des Stickstoffs
42, 44	Bromessigsäure	NaOH	0°C	Wasser	keine Reaktion
42, 44	Bromessigsäure	NaOH	50°C - 70°C	Wasser	Monoalkylierung
42, 44	Iodessigsäure	NaOH	0°C - 70°C	Wasser	keine Reaktion
42	Iodessigsäure-ethylester	NaOEt	0°C - 70°C	Ethanol	Monoalkylierung
42	Bromessigsäure	MgO	RT	Wasser	keine Reaktion
42	Bromessigsäure	Ag <sub>2</sub> O	RT	DMF	keine Reaktion
42,44	Iodessigsäure	MgO	0°C - 70°C	Wasser	keine Reaktion
42	Bromessigsäuremethylester	$K_2CO_3$	60°C	Aceton	Monoalkylierung
42	Bromessigsäuremethylester	$K_2CO_3$	60°C Mikrowelle	Aceton	Monoalkylierung
42	Bromessigsäuremethylester	$K_2CO_3$ + TBAI	100°C Mikrowelle	3-Pentanon	Dialkylierung
42	Bromessigsäuremethylester	$K_2CO_3$ + TBAI	108°C	3-Pentanon	Dialkylierung

**Tabelle 1:** Alkylierungsexperimente

Es zeigte sich, dass das Verhältnis von  $K_2CO_3$  zu Bromessigsäuremethylester von entscheidender Bedeutung für die Ausbeute war. Bei einem Basenüberschuss sanken die Ausbeuten rapide und die Reaktion fand praktisch nicht statt. Der Vorteil dieser Alkylierungsmethode war eine um eine Stufe verkürzte Synthese gegenüber dem Lysinlinker, da hier die Veresterung wegfiel, die leichtere Handhabbarkeit des Produktes, welches ohne die freien Säurefunktionen deutlich unpolarer war und sich gut in organischen Lösemitteln wie Dichlormethan löste. Somit war es problemlos säulenchromatographisch an Kieselgel aufzureinigen. Die anschließende Freisetzung des Phenols für die Anbindung an das Polymer erfolgte mit Pd/C in Methanol unter Wasserstoffatmosphäre und verlief quantitativ.



**Schema 3:** Reagenzien und Bedingungen: a) NaOH, CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, MeOH, Bn-Cl, (64%); b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, TBAI, Bromessigsäuremethylester, 3-Pentanon 108°C (55%); c) Pd/C, RT, MeOH (99.5%).

### 3.2 Polymermatrices für Enzymimmobilisierung

Vorarbeiten mit dem Lysinlinker, welche von G. Dräger durchgeführt wurden, zeigten, dass eine Immobilisation von Benzaldehydlyase an einem auf Polystyrolharz wie dem Merrifield-Harz<sup>78</sup> nicht möglich ist. So wurde eine neue Generation von Polymeren in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe U. Kunz (TU Clausthal) entwickelt. Diese Polymere weisen als entscheidenden Unterschied einen weiteren monomeren Baustein (Vinylpyrrolidinon) auf, welcher die für die Funktion des Chelatliganden unverzichtbare polare Umgebung im Polymer schafft. So können Enzyme nicht nur mittels IMAC aufgereinigt werden, sondern zeigen komplexiert am Polymer Aktivität (Kapitel 3.7).

Name	Divinylbenzol	Vinylbenzylchlorid	Vinylpyrrolidinon
Typ1	10%	50%	40%
Typ2	5%	95%	0%
Typ3	10%	70%	20%
Typ4	20%	60%	20%
Typ5	5%	60%	35%

**Tabelle 2:** Zusammensetzungen der verschiedenen eingesetzten Harze

<sup>78</sup> a) R. B. Merrifield, J. M. Steward, *Nature*, **1965**, 207, 522 – 523; b) R. B. Merrifield, *Science*, **1965**, 693, 178 – 185.

Um den Einfluss des Pyrrolidinons zu studieren, wurden fünf Harze mit einem *N*-Vinylpyrrolidinonanteil von 0-40% an der TU Clausthal dargestellt und im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Enzymaktivität getestet (Kapitel 3.7). Das geeignetste Polymer wurde zur weiteren Verwendung selbst dargestellt.

### 3.2.1 Exemplarische Darstellung des Polymeres vom Typ 3

Beim Polymer vom Typ 3 handelte es sich – wie bei allen hier verwendeten Polymeren - formal um ein Merrifield-Harz, dem bei der Polymerisation ein Anteil *N*-Vinylpyrrolidion beigemischt wurde, wodurch eine hydrophile Komponente im Polymer vorhanden war.<sup>79</sup> Diese verschaffte dem Chelatlinker eine Umgebung, die polar genug war, um seine Aktivität zu erhalten. Zur Darstellung wurde eine Mischung von Divinylbenzol, Vinylbenzylchlorid und Vinylpyrrolidinon entsprechend Tabelle 2 in Dodecan bei 70°C radikalisch polymerisiert<sup>80</sup>. Als Radikalstarter diente hierbei AIBN<sup>81</sup>. Die Polymerisation war nach 5 Std. abgeschlossen. Die anschließende Entfernung von Monomerresten mittels Soxhletextraktor erwies sich als praktikabel.

## 3.3 Anbindung der Linker an die Harze

### 3.3.1 Anbindung des Lysinlinkers an das Polymer vom Typ 3

Die Verknüpfung des Lysinlinkers mit dem Polymer (Schema 4) erfolgte mit Hilfe von NaO<sup>t</sup>Bu<sup>82</sup> in NMP. Dabei wurde der Linker in NMP vorgelegt, die Base und das Harz wurden zugegeben und die Mischung 72 Std. bei 60°C geschüttelt. Die Beladung betrug 15% der möglichen zu beladenden Positionen und wurde gravimetrisch und IR-

---

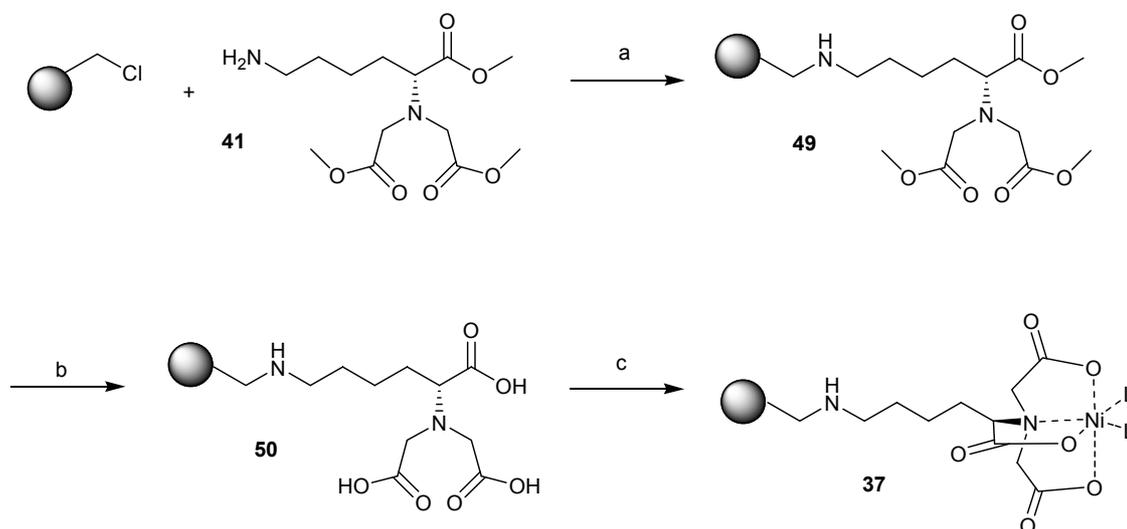
<sup>79</sup> U. Kunz, H. Schönfeld, A. Kirschning, W. Solodenko, *J. Chrom. A*, **2003**, 1006, 241 – 249.

<sup>80</sup> a) M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, G. K. Harmer, *Macromolecules*, **1993**, 26, 2987 – 2988 ; b) G. Moad, E. Rizzardo, D. H. Solomon, *Polym. Bull.*, **1982**, 6, 598

<sup>81</sup> J. Gromada, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **1999**, 32, 5199 – 5202.

<sup>82</sup> A. S. Hernández, J. C. Hodges, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3153 – 3157.

spektroskopisch bestimmt. Nicht veröffentlichte Studien (W. Solodenko, K. Menneke, A. Kirschning) haben ergeben, dass von den vorhandenen reaktiven Positionen am Polymer nur 40%-60% für eine Beladung zur Verfügung stehen. Im Vergleich dazu betrug die Beladung des Polymers mit dem NTA-Linker etwa 30%.



**Schema 4:** Reagenzien und Bedingungen: a) NaO<sup>t</sup>Bu, NMP, 60°C, 72 Std. (64%, gravimetrisch bestimmt); b) LiOH, MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) 50°C, 60 Std.; c) NiCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O/DMSO

Die Beladungen müssen mit Rücksicht auf die Tatsache betrachtet werden, dass hier nur eine Oberflächenbeladung notwendig war, da die Enzyme, nicht mit NTA-Linkern im Polymerinneren in Wechselwirkung treten. Nach der Aufarbeitung wurde der Linker am Harz basisch mit Lithiumhydroxid zum Chelatliganden verseift. Anschließend wurde mit einer gesättigten Lösung von NiCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O/DMSO (10:1) der Ni(II)-Komplex **37** etabliert. Die Zugabe von 10 % DMSO zur gesättigten NiCl<sub>2</sub>-Lösung hat sich als großer Vorteil erwiesen, da das Polymer durch das DMSO quoll und die Ni<sup>2+</sup>-Ionen schneller aufnehmen konnte. Dabei verfärbte sich das Polymer von seiner ursprünglichen hellgelben Farbe nach hellblau, wodurch die Beladung visuell verfolgt werden konnte.

### 3.3.2 Anbindung des Tyrosinlinkers an die verschiedenen Polymere

Analog zur Verknüpfung des Lysinlinkers mit dem Polymer sollte der Tyrosinlinker zunächst an das Polymer vom Typ 3 und dann zur Durchführung der Vergleichstests an die anderen in Tabelle 2 beschriebenen Harze gebracht werden. Zunächst wurde die für den Lysinlinker optimierte Methode getestet. Der Linker wurde in NMP vorgelegt und das

Harz und die Base wurden zugegeben. Nach 72 Std. bei 60°C konnte der Tyrosinlinker nicht IR-spektroskopisch auf dem Harz nachgewiesen werden. Weitere Bemühungen, den Linker auf das Harz aufzubringen schlugen fehl. Die phenolische OH-Gruppe zeigte, trotz hoher Acidität, keine Reaktion mit dem Polymer. Anschließend wurden Reaktionsoptimierungen mit Benzylchlorid in Lösung durchgeführt, da diese leichter zu analysieren waren als die Bindung des Linkers an das Harz. Hierzu wurde der Linker in NMP gelöst und mit verschiedenen Basen und TBAI als Additiv versetzt (Tabelle 3). Alle Reaktionen wurden bei 55°C für 14 Std. gerührt.

Rkt	Base	Additiv	Ergebnis
1	NaOEt	0.2 äq TBAI	keine Reaktion
2	NaO <sup>t</sup> Bu	-	Reaktion
3	NaO <sup>t</sup> Bu	0.2 äq TBAI	Reaktion
4	KOH	-	Reaktion
5	KOH	0,2 äq TBAI	Reaktion

**Tabelle 3:** Zusammensetzungen der verschiedenen, verwendeten Harze

Die in Tabelle 3 dargestellten Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch und über Massenspektrometrie verfolgt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Kupplung des Tyrosinlinkers an das Harz wie in Reaktionen 2-5 in Tabelle 3 dargestellt, getestet. In allen Versuchen zeigte sich keine detektierbare Reaktion. Die Basen wurden weiter variiert und es wurden Versuche zur Kupplung vom Tyrosinlinker an das Harz mit NaH<sup>83</sup>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>84</sup> und Hünig-Base<sup>85</sup> getestet. Wiederum wurde kein positives Ergebnis erzielt. Die Strategie wurde daraufhin umgestellt und es wurde Wang-Harz als alternative Methode getestet (Schema 5). Dazu wurde das ursprüngliche Polymer von Typ 3 mit 4-Hydroxybenzylalkohol **51** in DMF umgesetzt; als Base diente NaH. So wurde die Bindungsstelle im Harz von Benzylchlorid zu Benzylalkohol (Wang-Harz<sup>86</sup>) verändert. Die Transformation zum Wang-Harz konnte gravimetrisch ermittelt und IR-spektroskopisch durch den deutlichen Intensitätsrückgang der Chloridbande bei 708 cm<sup>-1</sup> nachgewiesen

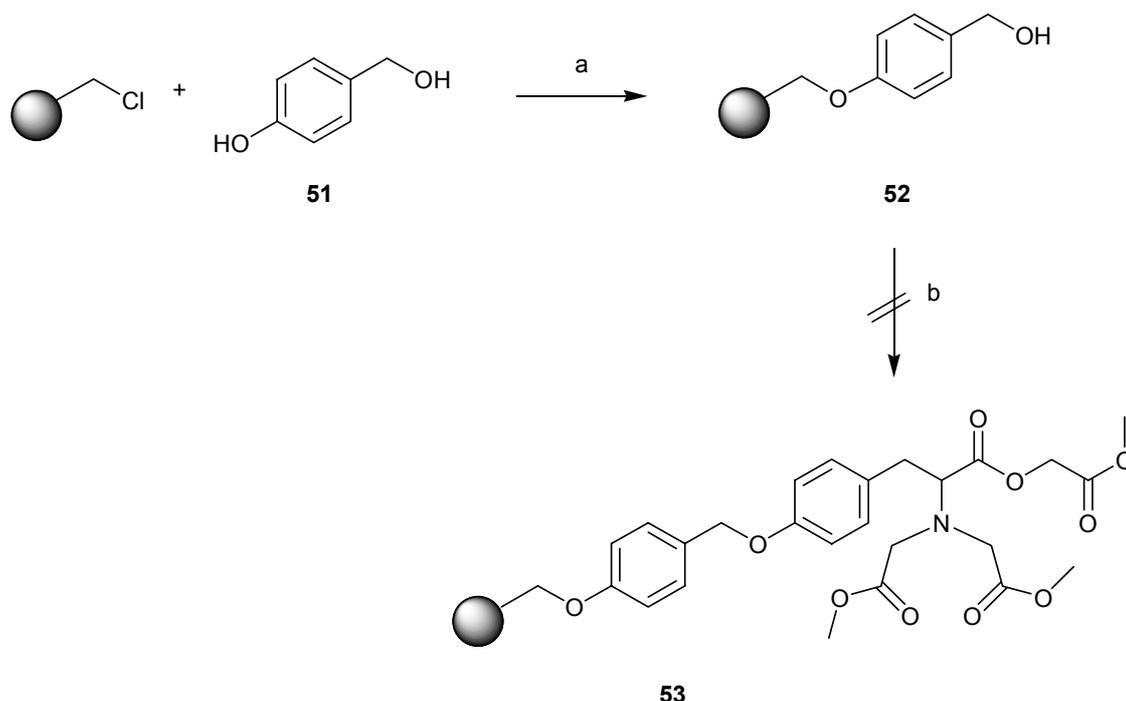
<sup>83</sup> D. Stones, D. J. Miller, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4975 – 4878.

<sup>84</sup> B. Chenera, J. A. Finkelstein, D. F. Veber, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11999 – 12000.

<sup>85</sup> J. Schwarz, V. P. Böhm, M. G. Gardiner, M. Grosche, W. A. Herrmann, W. Hilringer, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1773 – 1780.

<sup>86</sup> S. -S. Wang, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 6488 – 6491.

werden. Der Tyrosinlinker sollte nun mittels Mitsunobu-Reaktion<sup>87</sup> an das Polymer<sup>88</sup> gekuppelt werden. Hierzu wurde der Linker in NMP vorgelegt und bei 0°C mit Triphenylphosphan und anschließend mit DIAD (Diisopropylazodicarboxylat) versetzt. Im Anschluss wurde das Harz zugegeben und die Mischung 60 Std. bei RT geschüttelt. Nach der Aufarbeitung konnte der Linker nicht auf dem Harz nachgewiesen werden.



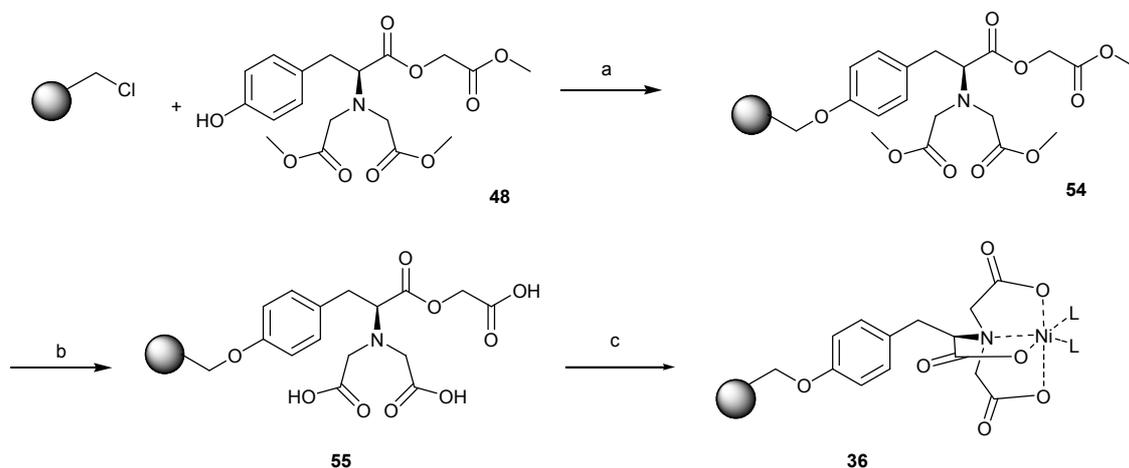
**Schema 5:** a) 51, NaH, DMF; b) P(Ph<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, DIAD, NMP

Um eine erfolgreiche und schnelle Kupplung des Phenols **48** zu gewährleisten wurde eine weitergehende Optimierung an dem chlorbenzylierten Harz (Typ 3) gestartet. Zunächst wurde das Lösungsmittel gewechselt. Anstatt NMP wurde DMF verwendet. Es wurden die gleichen Basen wie im ersten Anlauf getestet und TBAI durch CsI<sup>89</sup> ersetzt. Diese Vorgehensweise brachte den entscheidenden Durchbruch. Der Linker konnte erstmals am Polymer nachgewiesen werden (Abbildung 19).

<sup>87</sup> O. Mitsunobu, *Synthesis*, **1981**, 1 – 28.

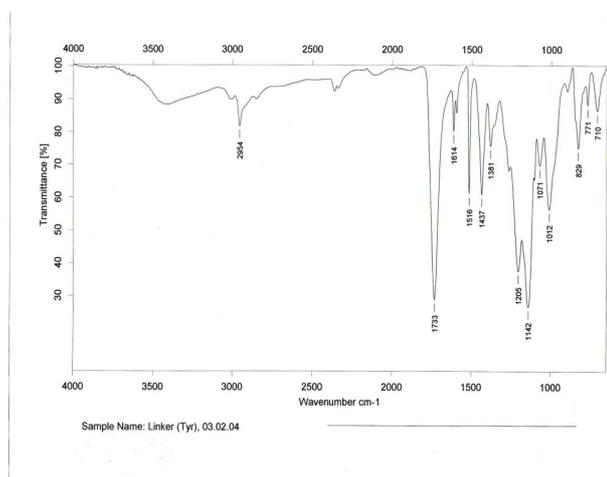
<sup>88</sup> L. S. Richter, T. R. Gadek, *Tet. Lett.* **1994**, 35, 4705 – 4706.

<sup>89</sup> B. Raju, T. P. Kogan, *Tetrahedron. Lett.* **1997**, 38, 4965 – 4970; K. Ngu, D. V. Patel, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 973 – 978.

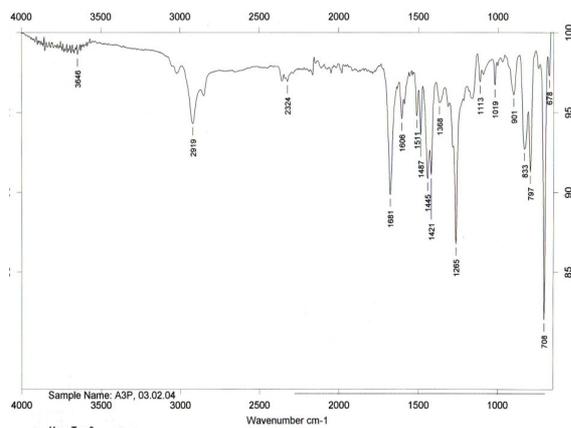


**Schema 6:** Reagenzien und Bedingungen: a) CsI, DMF, 60°C; b) LiOH, MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1); c) NiCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O/DMSO

Im IR-Spektrum des harzgebundenen Linkers sind alle relevanten Banden, die in den Spektren der Edukte (Abbildungen 17 und 18) vorkommen, wieder zu finden. Charakteristisch sind vor allem die Banden bei 708 cm<sup>-1</sup>, 1265 cm<sup>-1</sup>, 1445 cm<sup>-1</sup>, 1681 cm<sup>-1</sup> und 2919 cm<sup>-1</sup> des Polymers, sowie die Banden bei 1012 cm<sup>-1</sup>, 1142 cm<sup>-1</sup>, 1205 cm<sup>-1</sup>, 1516 cm<sup>-1</sup> und 1733 cm<sup>-1</sup>, die alle im Spektrum des Kupplungsproduktes (Abbildung 19) vorhanden sind.



**Abbildung 18:** IR-Spektrum (Golden Gate / ATR) des Tyrosinlinkers



**Abbildung 17:** IR-Spektrum (Golden Gate / ATR) des Polymers vom Typ 3

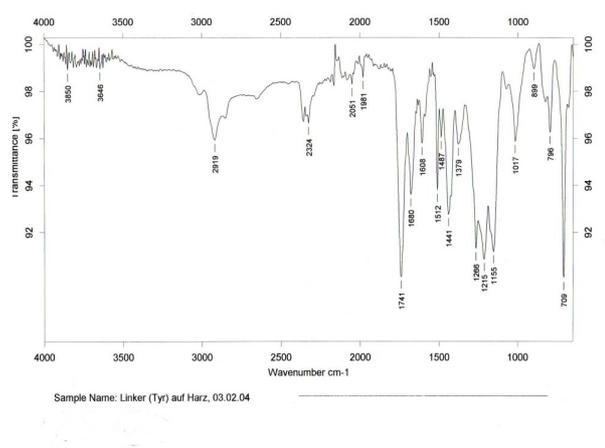


Abbildung 19: IR-Spektrum (Golden Gate / ATR) des an das Polymer (Typ 3) gekuppelten Tyrosinlinkers

### 3.4 Optimierung der Harzbeladung mit dem Tyrosinlinker

Im Anschluss daran wurden umfangreiche Optimierungen zur Beladung des Harzes mit dem Tyrosinlinker durchgeführt.

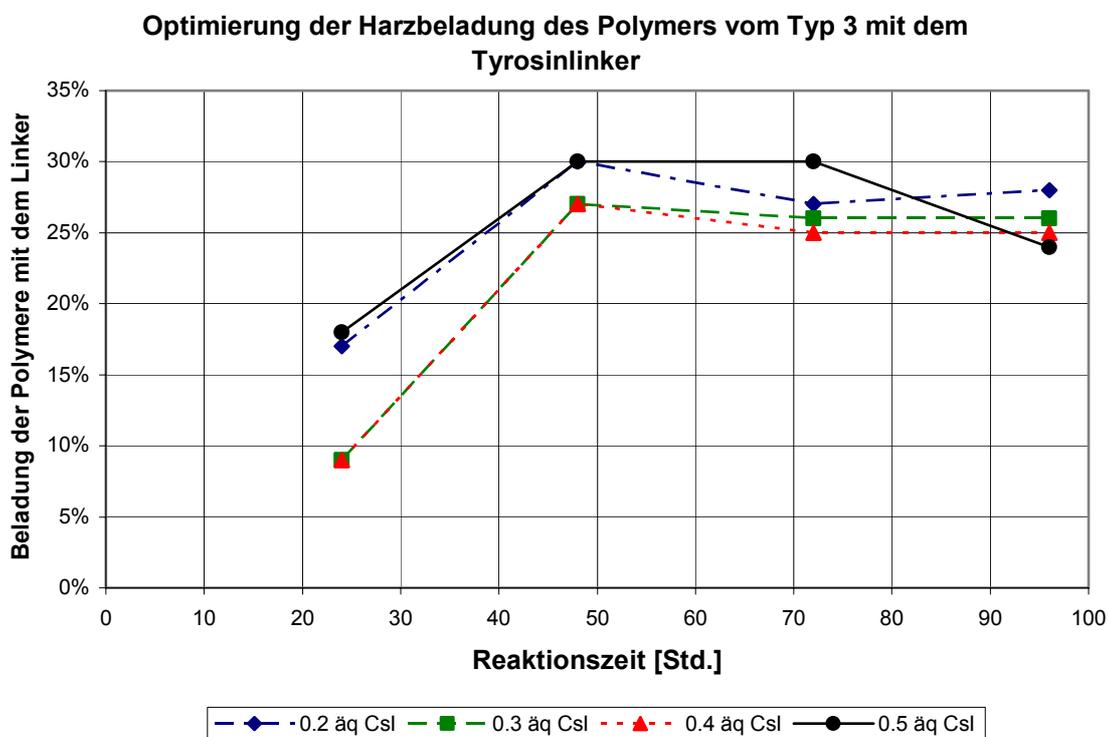


Abbildung 20: Optimierung der Beladung des Polymers (Typ 3) mit dem Tyrosinlinker.

Hierzu wurden sowohl die Menge an Csl, sowie die Reaktionszeiten variiert. Alle Reaktionen wurden bei 60°C in DMF durchgeführt und beziehen sich auf 200 mg des verwendeten Harzes. Die Reaktionsmischungen wurden mit 120 rpm geschüttelt. Die Beladungen wurden gravimetrisch und mittels IR-Spektroskopie bestimmt. Die so erreichten Beladungen sind in Abbildung 20 graphisch aufgetragen. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass die höchste Beladung bei einer Reaktionszeit von 50 Std. und einem Zusatz von 0.5 Äquivalenten Csl erreicht wurde. Im Anschluss wurden alle vorhandenen Polymere (siehe Tabelle 2) auf diese beschriebene Weise mit dem Tyrosinlinker beladen (Tabelle 4). Danach wurde der Polymergebundene NTA-Linker mit Lithiumhydroxid in MeOH/H<sub>2</sub>O verseift und so der Chelatligand freigesetzt. Hierzu wurden die verschiedenen Reaktionsmischungen bei 50°C für 60 Std. geschüttelt. Die anschließende Beladung der einzelnen Polymere mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen konnte visuell verfolgt werden, da sich die Polymere durch die Ni<sup>2+</sup>-Ionen deutlich von ihrer ursprünglichen hellgelben Farbe nach hellblau verfärbten.

Polymer	Beladung absolut	Beladung [%]
Typ 1	49 mg	13 %
Typ 2	79 mg	22 %
Typ 3	110 mg	30 %
Typ 4	40 mg	11 %
Typ 5	44 mg	12 %

**Tabelle 4:** Beladungen der verschiedenen Harze mit dem Tyrosinlinker

Die so vorbereiteten Polymere konnten nun für die IMAC getestet werden. Hierzu wurden die Harze alle mit Benzaldehydlyase beladen anschließend werden die jeweiligen Mengen des immobilisierten Enzyms per Bradford-Assey<sup>90</sup> miteinander verglichen (Abbildung 6). Danach wurden die beladenen Polymere mit Benzaldehyd in einem Reaktionspuffer versetzt und die Umsetzung zu Benzoin vergleichend verfolgt (Abbildung 14). Das in diesen Tests beste Polymer wurde dann auf seine Ladekapazität, Aufreinigungsfähigkeit und Enzymaktivität getestet und mit dem bekannten Lysin-basierten NTA-Linker verglichen. Dazu muss zunächst die Benzaldehydlyase (BAL) in *E. coli* exprimiert werden.

<sup>90</sup> M. A. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248 – 254.

### **3.5. Expression von BAL in *E. coli***

Die für diese Arbeit zur Verfügung gestandenen *E. coli* Stämme beinhalteten das Plasmid für eine rekombinante Expression der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens*. Die Initiation der Genexpression erfolgte durch den IPTG<sup>91</sup>-induzierbaren *lac*-Promoter. Für die Expression wurde zunächst bei 37°C und 60 rpm eine „Über Nacht Kultur“ gezogen, aus der das Produktionsmedium angeimpft wurde. Es wurde im 750 mL Maßstab kultiviert, wiederum bei 37 °C und 60 rpm. Nach ca. 3 Std., als eine optische Dichte von 0.6 bis 0.9 erreicht war, wurde die Expression von BAL (His<sub>6</sub>-tag) mit IPTG induziert. Nach 24 Std. wurden die Zellen eisgekühlt und mittels Zentrifugation (20 min bei 10000 rpm) geerntet. Die Zellen wurden in Phosphatpuffer (pH 7.0) aufgenommen und mittels Ultraschall (3 x 30 s, 30 Watt) lysiert. Anschließend wurden sie tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Kugeln bei -78°C gelagert. Diese Form der Portionierung bietet die Möglichkeit für jede Anwendung die jeweils nötige Menge an Zellyse aufzutauen und zu verwenden. So konnten alle folgenden Versuche aus einem Expressionsansatz getätigt werden, was eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Daten bot. Vor der Immobilisierung der Benzaldehydlyase auf den verschiedenen Polymeren wurde ihre Aktivität in Lösung getestet. Hierzu wurde zu einer kleinen Menge Zellyse ein wenig Benzaldehyd und Reaktionspuffer (Kapitel 9.10.1) gegeben und die Umsetzung zu Benzoin mittels DC verfolgt. Das Benzoin wurde im Anschluss gereinigt und vollständig charakterisiert.

### **3.6. Beladung der mit dem Tyrosinlinker beladenen Polymere (Typ 1 – 5) mit BAL aus der Zellyse von *E. coli***

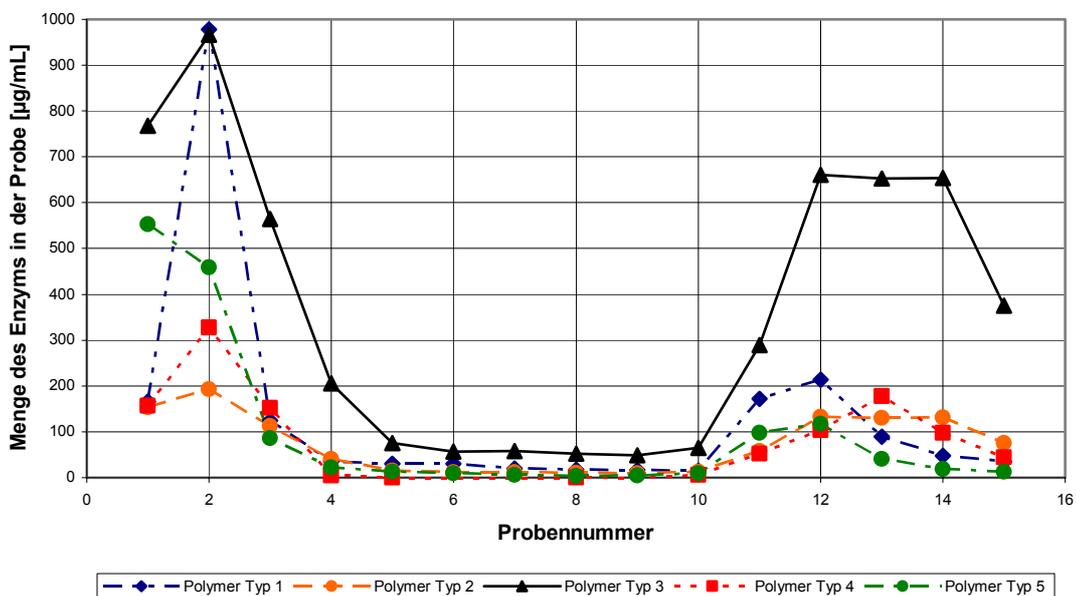
Alle mit dem Tyrosinlinker beladenen Polymere lagen nickelbeladen vor. Da die Oberflächenbeladungen der einzelnen Polymere mit dem Linker variieren kann, wurde bei dieser Untersuchung das Hauptaugenmerk auf die Aufreinigungsfähigkeit des jeweiligen Polymers gerichtet und erst in zweiter Linie auf die Höhe der Beladung. Die durch Zentrifugation von den Zelltrümmern befreite Zellyse wurde mit der gleichen Menge Lysispuffer versetzt und auf das Harz gegeben. Nach ca. einer Minute wurde die Flüssigkeit mittels Unterdruck abgesaugt und die so beladenen Polymere wurden mit

---

<sup>91</sup> Isopropyl-1-thio- $\beta$ -galactopyranosid

Lysispuffer und Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine aus der Zellyse von *E. coli* zu entfernen. Die Elution der durch die Ni<sup>2+</sup>-Ionen komplexierten Benzaldehydlyase erfolgte durch den Einsatz eines Elutionspuffers, der eine höhere Konzentration (250 mmol/L) an Imidazol enthält, welches mit dem His<sub>6</sub>-tag um die Ni-Ionen konkurriert. Die Affinität des Imidazols zum Ni<sup>2+</sup> ist in dieser Konzentration so hoch dass die Benzaldehydlyase in Lösung geht. Aus diesen portionsweise aufgefangenen Lösungen wurden Proben für den Bradford-Assay entnommen. Dabei wurde der zu prüfenden Lösung ein Farbstoff (Cumasie Brillant Blau) gegeben, welcher eine Absorption bei 450 nm, sowie bei 590 nm hervorruft, wenn eine Bindung zu Proteinen vorliegt. Über den Quotienten der Absorption kann die in der jeweiligen Lösung enthaltene Proteinmenge bestimmt werden<sup>92</sup>. Die Gesamtmenge ergibt sich durch Addition der Teilmengen in die einzelnen Fraktionen. In Abbildung 21 sind die Bradford-Assays der einzelnen Polymere dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Harz vom Typ 3 mit Abstand die größte Menge Enzym immobilisiert hat.

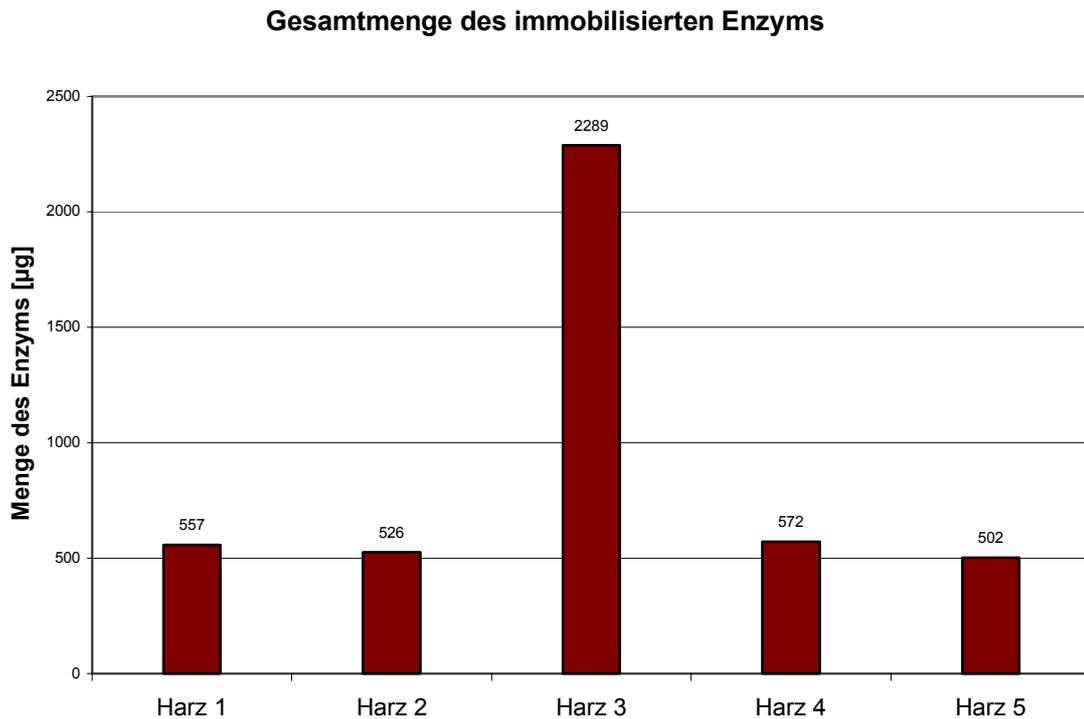
### Bradford - Assays der verschiedenen Harze im Vergleich



**Abbildung 21:** Immobilisierungsfähigkeit der einzelnen Polymere mit Tyrosinlinker.

Abbildung 22 zeigt die Gesamtmenge an immobilisiertem Enzym auf den jeweiligen Polymeren und bestätigt das Ergebnis, dass das Polymer vom Typ 3 die besten Immobilisierungsfähigkeit für das Enzym mit His<sub>6</sub>-tag besitzt.

<sup>92</sup> K. J. Siebert, P. Y. Lynn, *J. Am. Soc. Brewing Chem.*, **2005**, 63, 163-170.

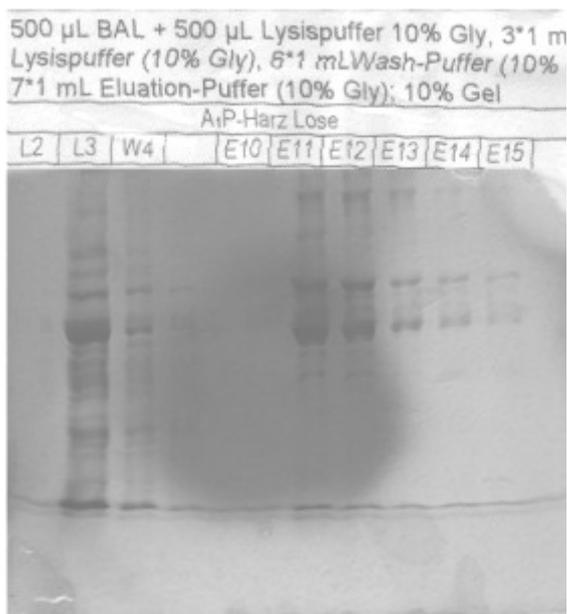


**Abbildung 22:** Vergleich der insgesamt von den einzelnen Polymeren immobilisierten Enzymmengen

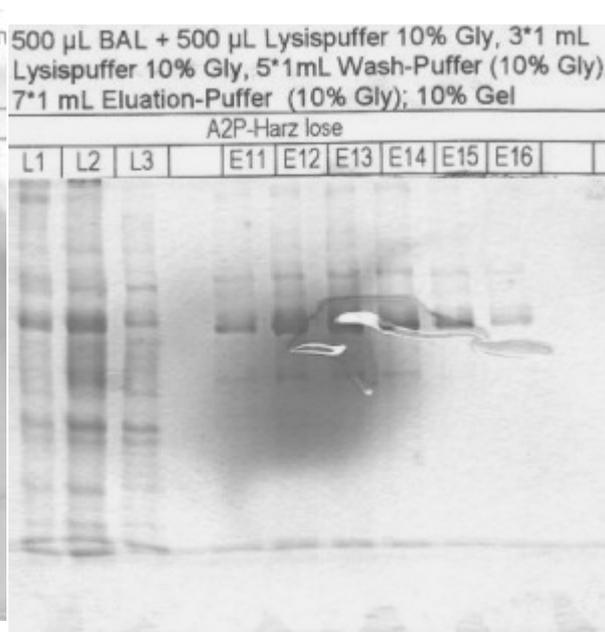
Auch die anderen Polymere besaßen gewisse Enzymaffinitäten. Von den bei den Bradford-Assays genommenen Fraktionen wurden zur Bestimmung der Reinheit des immobilisierten Enzyms denaturierende SDS-Gelelektrophoresen<sup>93</sup> durchgeführt, um zu entscheiden, welches der Polymere für die IMAC am besten geeignet war. Die entsprechenden Gele sind in den Abbildung 23 – 28 zu sehen.

---

<sup>93</sup> U. K. Leammli, *Nature*, **1970**, 227, 680 – 685.

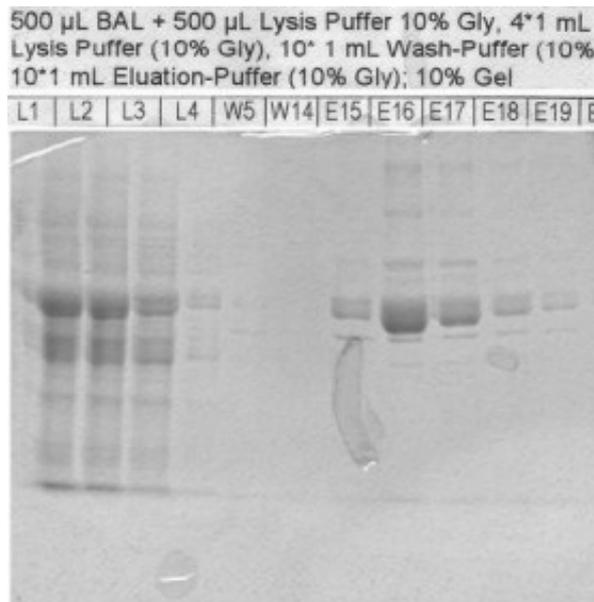


**Abbildung 23:** SDS-Page der Immobilisierung von BAL auf dem Polymer (Typ 1).

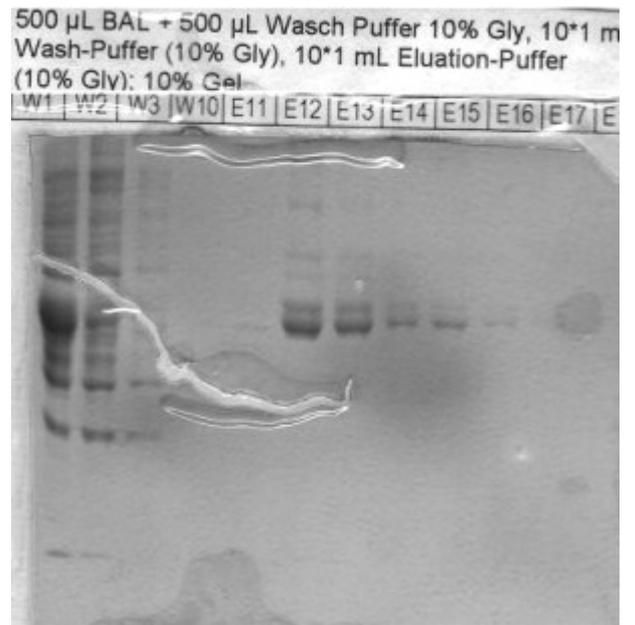


**Abbildung 24:** SDS-Page der Immobilisierung von BAL auf den Polymer (Typ 2).

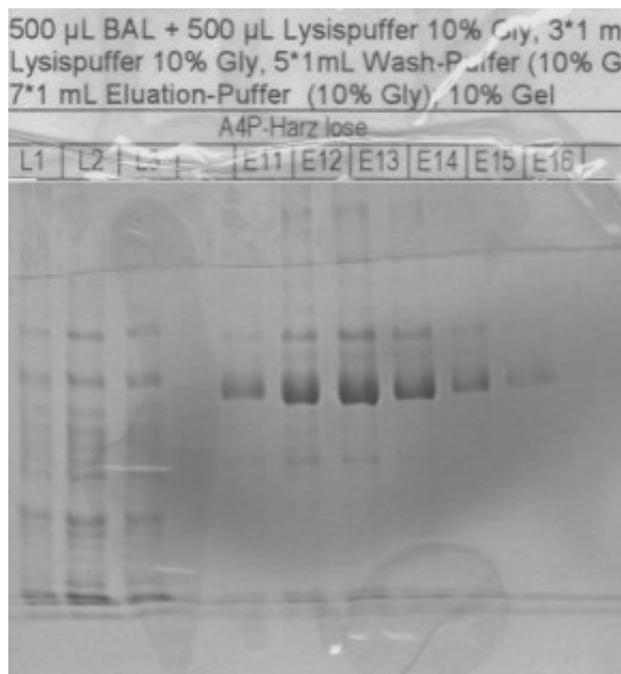
Auffallend war, dass alle fünf getesteten Ni-NTA-Polymere zumindest leichte Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen aufwiesen. Am stärksten verunreinigt waren die Fraktionen der Polymere 1, 4 und 5. Sie erwiesen sich damit für die Aufreinigung von Enzymen mittels IMAC als nicht gut geeignet. Interessanterweise waren die Fraktionen des Polystyrolharzes (Typ 2) im Verhältnis dazu sehr sauber. Da aber auf diesem Harz die Beladung sehr gering war und eine Aktivität des Enzyms darauf als unwahrscheinlich angenommen wurde, kam ausschließlich das Polymer 3 für die Anwendung der IMAC in Frage, dessen Elutionsfraktionen nur geringe Spuren von Verunreinigungen enthielten. Diese ließen sich durch Optimierung der Beladungsmethode noch reduzieren. Dennoch lag die Immobilisierungsfähigkeit weit über dem Bereich dessen, was das etablierte, auf dem Lysinlinker beruhende System, zu leisten im Stande war.



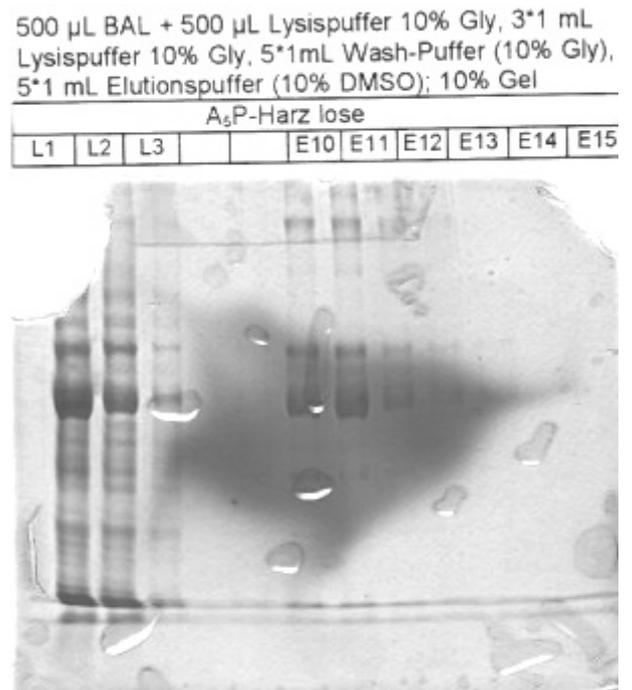
**Abbildung 25:** SDS - Page der Immobilisierung von BAL auf dem Polymer (Typ 3).



**Abbildung 26:** SDS - Page der Immobilisierung von BAL auf dem Polymer (Typ 3) mit



**Abbildung 27:** SDS - Page der Immobilisierung von BAL am Polymer (Typ 4).



**Abbildung 28:** SDS - Page der Immobilisierung von BAL am Polymer (Typ 5).

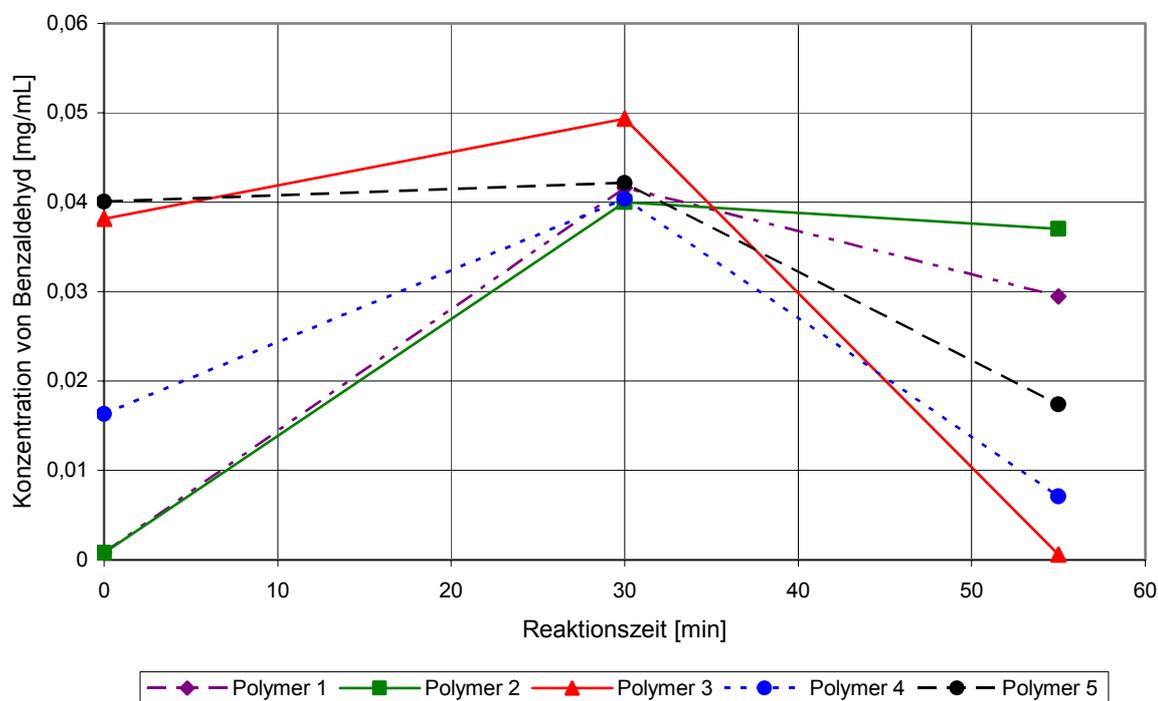
Zur Optimierung der Aufreinigungsfähigkeit des Polymers 3 wurde bei der Beladung des Polymers die Imidazolkonzentration verdoppelt (von 5 mM auf 10 mM). Dies hatte einen

geringen Verlust der Beladungskapazität von 1700  $\mu\text{g}$  auf 1350  $\mu\text{g}$  zur Folge, minimierte aber die unspezifischen Bindungen an das Harz und erhöhte dadurch die Reinheit. Zunächst sollte aber die Aktivität der immobilisierten Benzaldehydlyase auf den unterschiedlichen Polymeren getestet werden.

### 3.7. Umsetzung von Benzaldehyd und Synthese von (*R*)-Benzoin mittels immobilisierter Benzaldehydlyase.

Die Umsetzung des Benzaldehyds zu (*R*)-2-Hydroxy-1,2-diphenylethanon wurde bei 37°C durchgeführt, welches die optimale Temperatur für die Aktivität des Enzyms<sup>94</sup> war. Die Beobachtung der Reaktionsfortschritte erfolgte mittels Gaschromatographie.

**Konzentrationsverlauf von Benzaldehyd beim Umsatz mit Festphasengebundener BAL**



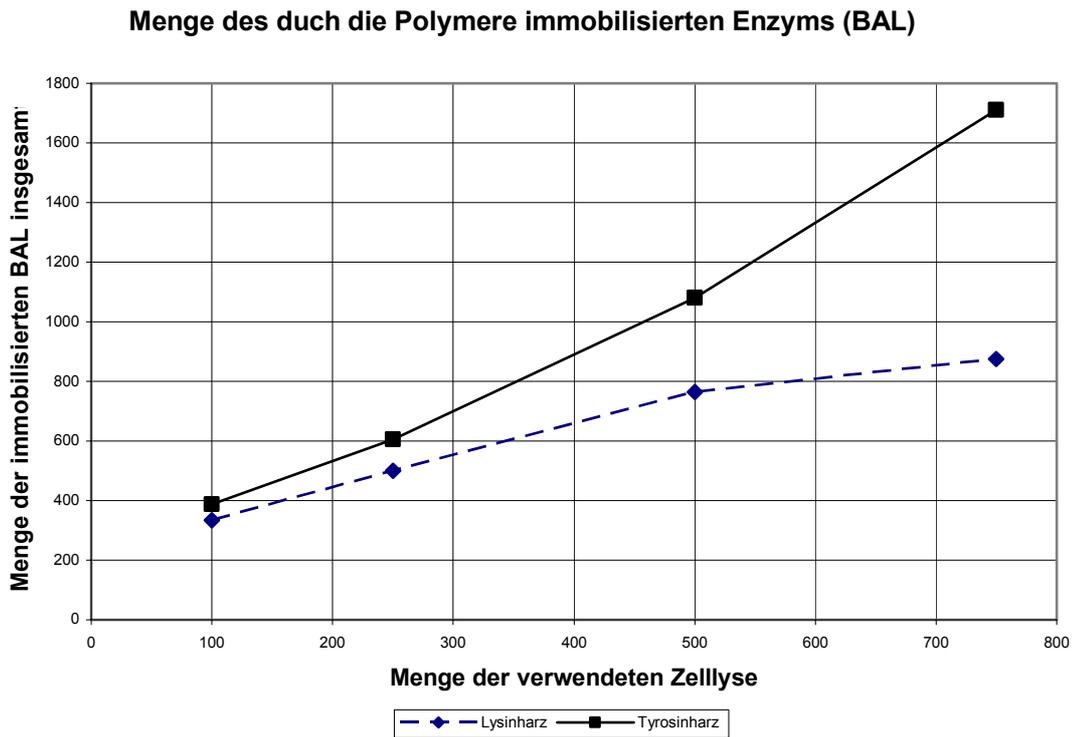
**Abbildung 29:** Verlauf der Konzentration von Benzaldehyd beim Umsatz mit auf den verschiedenen Polymeren immobilisierter Benzaldehydlyase

<sup>94</sup> E. Janzen, *Dissertation*, Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf, 2002;

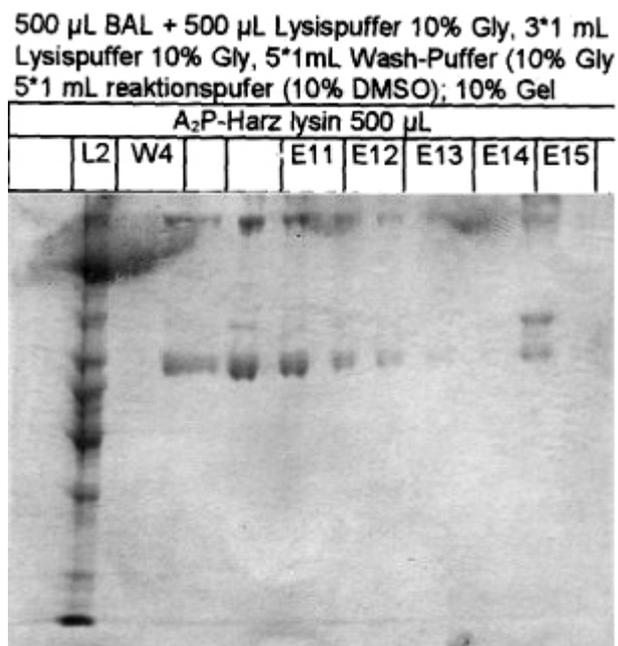
Abbildung 29 zeigt, dass nur beim Polymer vom Typ 3 ein vollständiger Umsatz stattfand. Die unterschiedlichen Konzentrationen von Benzaldehyd zu Beginn der Versuche erklären sich aus der Reaktionsdurchführung. So wurde der Benzaldehyd zur Reaktionslösung gegeben und direkt im Anschluss eine Probe mit einer Eppendorf-Pipette entnommen. Da sich der Benzaldehyd zu diesem Zeitpunkt auf der wässrigen Phase befand, wurden versehentlich unterschiedliche Mengen davon mit der Eppendorfpipette entnommen. Innerhalb von ein paar Minuten, löste sich der Benzaldehyd durch das im Reaktionspuffer befindliche DMSO. Es wurde versäumt an diesem Punkt weitere Proben zu entnehmen. Wie erwartet, fand praktisch keine Umsetzung bei den Polymeren 2 und 1 statt. Die Aktivität der BAL auf Polymer 5, welches einen hohen Anteil von *N*-Vinylpyrrolidion (Tabelle 2) besitzt, war schon deutlich eingeschränkt, während die beiden Polymere mit jeweils 20 % *N*-Vinylpyrrolidion demgegenüber eine deutlich höhere Aktivität des Enzyms zuließen. Aufgrund dieser Daten und unter Berücksichtigung der Immobilisations- und Aufreinigungseigenschaften wurde im Folgenden mit dem Polymer vom Typ 3 gearbeitet. Es wurde getestet, wie viel Enzym maximal auf das Harz geladen und wie viel Benzaldehyd damit umgesetzt werden konnte. Die Möglichkeit, mehrerer aufeinander folgender Reaktionen, ohne eine Regeneration des Polymers durchzuführen, war im Folgenden ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen. Abschließend sollte das System auf die Methode der *PASSflow*-Technik angewendet werden. Alle Versuche wurden vergleichend mit dem etablierten Chelatlinker-System auf Basis von Lysin durchgeführt.

#### **3.8 Maximale Beladung der Polymere (Typ 3) mit BAL**

Zum Vergleich der Immobilisierungskapazität für Enzyme mit His<sub>6</sub>-tag wurden je 200 mg beider Harze mit Ni<sup>2+</sup> beladen und jeweils mit Mengen zwischen 100 µL und 750 µL Zellyse umgesetzt. Nach jeder Beladung wurden die Harze regeneriert und frisch mit Ni-Ionen beladen. Die Beladungskapazität ist in Abbildung 30 dargestellt. Bei Betrachtung der Beladung der beiden Polymere zeigte sich, dass die Immobilisierungskapazitäten für BAL beim Polymer mit dem Tyrosin-basierten Linker, deutlich höher lagen, als beim zum Vergleich dargestellten Lysin-basierten Linker-System. Bei der Betrachtung der Reinheit des immobilisierten Enzyms auf den Polymeren waren bei dem Tyrosin-basierten Linker-System weniger starke Verunreinigungen (Abbildung 26) zu erkennen, als bei dem Vergleichssystem mit Lysin (Abbildung 31).



**Abbildung 30:** Test zur maximalen Beladungskapazität der losen Harze mit BAL



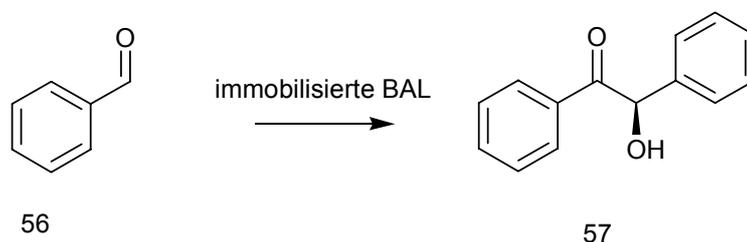
**Abbildung 31:** Immobilisierung von BAL auf dem Lysinharz lose (aus 500  $\mu$ L Zelllyse).

### 3.9 Umsetzungen von Benzaldehyd mit Festphasen-gebundener Benzaldehydlyase – Vergleich der Linkersysteme

#### 3.9.1 Optimierung des Reaktionspuffers und Bestimmung der Enzym-Auswaschungen (Leaching)

Da beide Linkersysteme die Fähigkeit zur Enzymimmobilisierung auf dem neu entwickelten Polymere bewiesen haben, sich das Tyrosin-basierte Chelatlinkersystem aber als deutlich im Vorteil gezeigt hat, stand die Betrachtung der Enzymaktivität am jeweiligen Polymer aus. Hierzu wurden verschiedene Mengen von Benzaldehyd mit dem jeweiligen Polymer in einem Reaktionspuffer bei 37°C versetzt. Wie beim Vergleich der unterschiedlichen Tyrosin-basierten Linker-Systeme (Kapitel 3.7) wurden hier die Reaktionen mittels Gaschromatographie verfolgt und verglichen.

Zum Vergleich der beiden Linker-Systeme (Lysin-basiert und Tyrosin-basiert), wurden verschiedene Mengen an Benzaldehyd mit immobilisierter Benzaldehydlyase zu Benzoin umgesetzt (Schema 7) und die Reaktionen mittels Gaschromatographie verfolgt.



**Schema 7:** Darstellung von Benzoin aus Benzaldehyd mittels immobilisierter Benzaldehydlyase (BAL).

Alle Reaktionen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. (15  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  und 200  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd). Bevor die Reaktionen durchgeführt wurden, wurde eine Optimierung des Reaktionspuffers in Lösung durchgeführt. Hierzu wurden Reaktionen bei pH 6.5 und pH 7.0 durchgeführt, sowie die Menge des zum Reaktionspuffer zugesetzten DMSO variiert (Tabelle 5). Die Reaktionen wurden mit 15  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd durchgeführt und 90 min. per Dünnschichtchromatographie verfolgt.

Puffer	DMSO-Anteil	Ergebnis
1	0 %	kein Umsatz
2	5 %	wenig Umsatz
3	10 %	vollständiger Umsatz
4	15 %	wenig Umsatz
5	20 %	wenig Umsatz

**Tabelle 5:** Variation des DMSO-Anteils im Reaktionspuffer

Dabei zeigte sich, dass bei einem pH-Wert von 6.5 die Reaktion nicht stattfand. Dies ließ sich auf die Aktivität der Benzaldehydlyase, die nach Untersuchungen von Liese et al.<sup>95</sup> bei einem pH Wert von 9.5 am höchsten ist, zurückführen.

Des Weiteren war die Reaktionsführung bei einem pH-Wert deutlich über pH 8.0 nicht realisierbar, da die Ni<sup>2+</sup>-Ionen Nickelhydroxid bilden (welches deutlich an einen Farbumschlag von hellblau nach graublau zu erkennen war) mit dem keine Affinitätschromatographie mehr möglich war, da die Enzyme nicht mehr immobilisiert werden konnten. Die in der gleichen Arbeit beschriebene Toleranz der BAL gegenüber 30 vol% DMSO kann hier nicht bestätigt werden. Schon bei einer Konzentration von 15 vol% DMSO war ein deutlicher Aktivitätsrückgang der Benzaldehydlyase zu beobachten, welcher in der Hauptsache auf die Denaturierung des Enzyms zurückzuführen war.

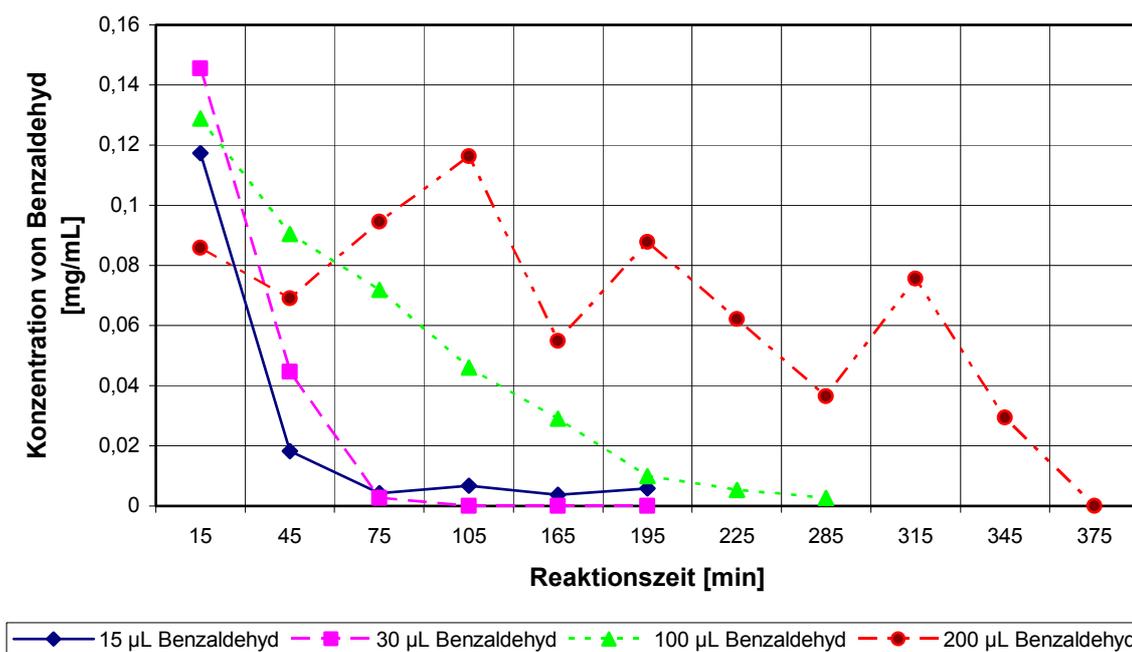
Ein mögliches Leaching des Enzyms vom Polymer wurde durch Entnahme von Proben sowohl aus dem Filtrat, als auch aus den Elutionsfraktionen geprüft, die mittels Bradford-Assay auf ihren Proteingehalt untersucht wurden. Alle entnommenen Proben des Reaktionspuffers wiesen keinen Proteingehalt auf. In den Proben der Elution konnte hingegen das Vorhandensein von Protein nachgewiesen werden. Wobei hierbei zu beachten war, dass das entstandene Produkt zuerst vom Polymer gewaschen werden musste, damit ein Eluieren des Proteins möglich war. Es zeigte sich, dass das sich bildende Produkt nicht leicht von der polymeren Phase diffundierte. Es entwickelte sich eine Schicht aus Produkt auf dem Polymer, welche letztendlich zu einer Limitierung der auf einmal umsetzbaren Menge des Benzaldehyds führte (Kapitel 3.9.2.).

<sup>95</sup> P.D De María, T. Stillger, M. Pohl, S. Wallert, H. Drauz, H. Gröger, H. Trauthwein, A. Liese, J. *Molec. Cat. B: Enzymatic.*, **2006**, *38*, 43-47.

### 3.9.2 Umsetzung von Benzaldehyd mit dem Lysin-Harz

Das Lysin-Polymer wurde mit Benzaldehydlyase aus 250  $\mu\text{L}$  Zellyse beladen und gewaschen. Alle Reaktanden wurden im Reaktionspuffer vorgelegt und zum Schluss das Polymer mit dem immobilisierten Enzym versetzt. Alle 30 Minuten wurde eine Probe entnommen und mittels Gaschromatographie die Abnahme der Konzentration von Benzaldehyd aus der Reaktionsmischung verfolgt. Die Daten sind in Abbildung 32 gezeigt. Daraus ist ersichtlich, dass die Umsetzung von 15  $\mu\text{L}$  und 30  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd schnell und glatt verlaufen. Bei 100  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd wird die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich langsamer und der Umsatz von 200  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd erfolgt nur noch sehr langsam. Von einer Umsetzung von mehr als 200  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd wurde daher abgesehen. Die Benzoinausbeuten lagen zwischen 93,0 % und 99,9%.

**Benzaldehydkonzentrationen beim Umsatz mit BAL auf Lysinlinker**



**Abbildung 32:** Verlauf der Benzaldehydkonzentrationen beim Umsatz mit auf dem Lysinlinkersystem

Der Verlust der Aktivität des Enzyms bei diesem Versuch wurde wieder der kompetitiven Hemmung durch das Produkt zugeschrieben. In diesem Reaktionssystem konnten Schwierigkeiten beim Abtransport des Produktes in den Reaktionspuffer beobachtet werden, da vollständige Ausbeuten nur durch Spülen des Polymers mit einem organischen Lösemittel zu erreichen waren.

Bestände die Möglichkeit, das Produkt von der polymeren Phase zu lösen, ohne dabei die Aktivität der Benzaldehydlyase zu beeinträchtigen, könnten auch größere Mengen Benzaldehyd umgesetzt werden (Kapitel 3.9.4).

#### **3.9.3 Umsetzung von Benzaldehyd mit dem Tyrosin-Harz**

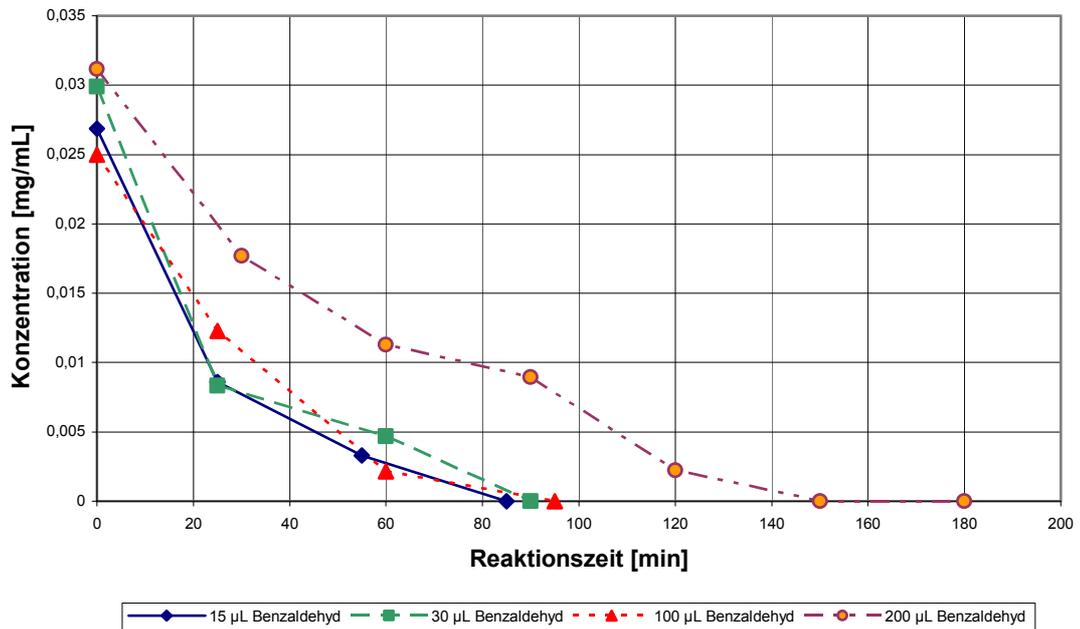
Das Tyrosin-Linkersystem wurde – wie auch das Lysinlinkersystem – mit Benzaldehydlyase aus 250  $\mu\text{L}$  Zellyse beladen und gewaschen. Der Benzaldehyd wurde im Reaktionspuffer vorgelegt und das enzymbeladene Polymer wurde zugesetzt. Aus Abbildung 33 ist zu entnehmen, dass die Umsetzungen von 15  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$  und 100  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd glatt und schnell verliefen, während 200  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd deutlich langsamer zu Benzoin reagierte, wobei die Reaktion trotzdem vollständig war. Die Umsetzung von 500  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd verläuft nicht mehr vollständig, weshalb sie in Abbildung 34 gesondert dargestellt ist. Von einer Umsetzung größerer Mengen Benzaldehyd wurde daher abgesehen. Die Ausbeuten der vollständigen Umsetzung (15  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ ) lagen ebenfalls zwischen 93.0% und 99.0 %, bei der Umsetzung von 500  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd nur bei 74 %.

Auch hier wurde das gleiche Problem beobachtet, wie schon beim vorhergegangenen Versuch mit dem Lysin-basierten Linker-System. Der Abtransport des Produkts von der polymeren Phase fand nur unzureichend statt.

Die Versuche haben gezeigt, dass beide Chelatliganden gute Ergebnisse in der Aufreinigung und Immobilisierung von Enzymen mit His<sub>6</sub>-tag lieferten, wobei der Tyrosinlinker eine deutlich höhere Kapazität aufwies, bei mindestens gleich guter Aufreinigung des Enzyms. Die Aktivität des Enzyms wurde auf beiden Oberflächen in der gleichen Weise beeinflusst, so dass die Umsetzungen des Substrates in ähnlicher Geschwindigkeit mit den gleichen guten Ausbeuten stattfanden.

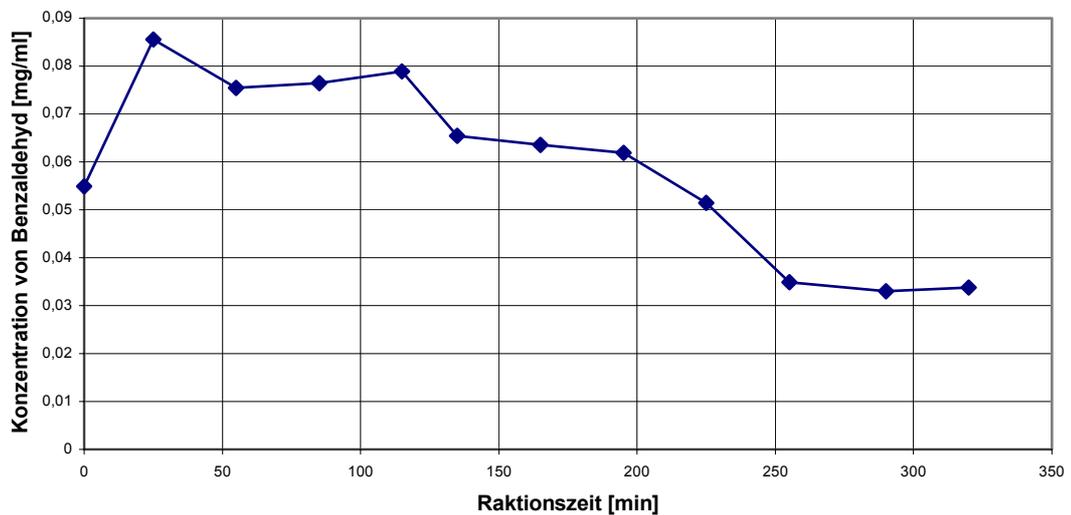
Zur Lösung des Problems wurde versucht, eine Möglichkeit zu finden, das Produkt von der polymeren Phase zu lösen ohne die Aktivität des Enzyms merklich einzuschränken.

**Benzaldehydkonzentrationen beim Umsatz mit BAL auf Tyrosin-Harz**



**Abbildung 33:** Verlauf der Benzaldehydkonzentrationen beim Umsatz mit auf dem Tyrosin-Linkersystem immobilisierter BAL.

**Konzentrationsverlauf von Benzaldehyd bei der Umsetzung von 500 µL mit Festphasen-gebundener BAL**



**Abbildung 34:** Verlauf der Benzaldehydkonzentrationen beim Umsatz von 500 µL Benzaldehyd mit auf dem Tyrosin-Linkersystem immobilisierter BAL

### 3.9.4 Wiederverwendbarkeit des Tyrosin-Harzes

Ein interessanter Aspekt in der Verwendung von immobilisierten Enzymen ist die Möglichkeit der wiederholten Verwendung ohne Regeneration der festen Phase. Diese Vorgehensweise setzt Enzyme den klassischen heterogenen Katalysatoren gleich<sup>96</sup>. Am Beispiel der Benzaldehydlyase wurde diese Möglichkeit getestet, bevor die Übertragung der Methode auf die *PASSflow*-Technik erfolgte. Zudem sollte überprüft werden, ob so das Problem des mangelnden Abtransports des Produkts vom Polymer gelöst und damit die Möglichkeiten, größere Mengen Benzaldehyd mit einer Enzymcharge umzusetzen, realisiert werden könnte. Hierbei wurden 100 mg des Polymers vom Typ 3 mit dem Tyrosin-Linker als Testsystem gewählt und vor der ersten Umsetzung frisch mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen und anschließend mit dem Enzym aus 250 µL Zellyse beladen. Es sollten viermal je 30 µL Benzaldehyd mit immobilisierter Benzaldehydlyase umgesetzt werden. Nach jedem Lauf wurde das Polymer mit 15 mL eines organischen Lösemittels gespült um das Produkt vollständig vom Polymer zu waschen. Für das Spülen des Harzes wurden verschiedene organische Lösemittel getestet (Tabelle 6).

Rkt	verwendetes Lösemittel	Ergebnis
1	Aceton	Verlust der Aktivität
2	Ethanol	Verlust der Aktivität
3	Butanol	bedingter Erhalt der Aktivität
4	MTB-Ether	Erhalt der Aktivität
5	Ethylacetat	Erhalt der Aktivität

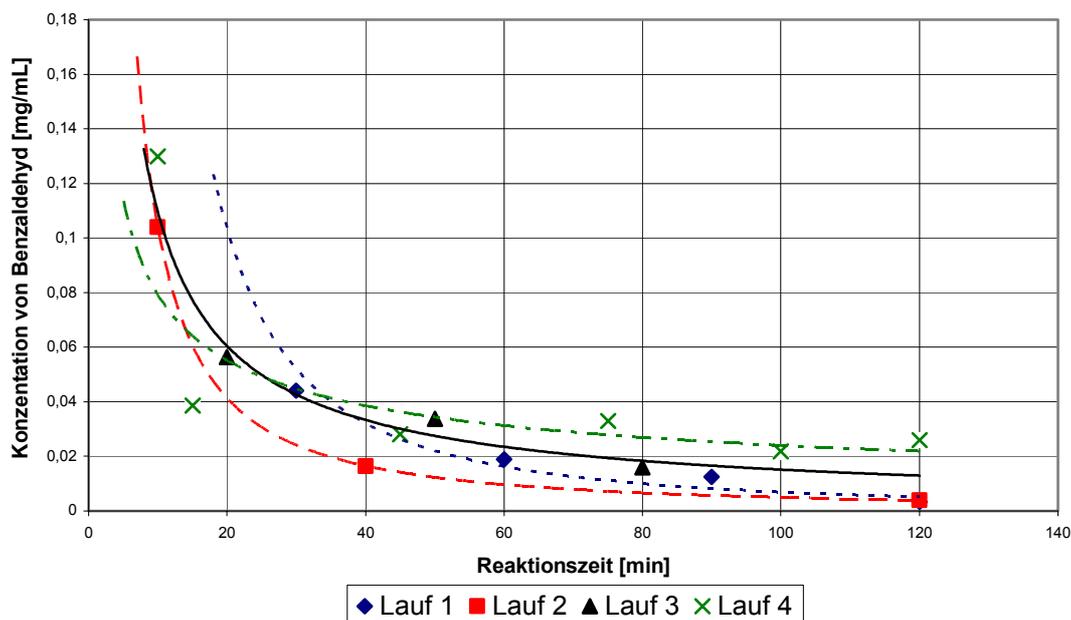
**Tabelle 6:** Optimierte Aufarbeitung bei der wiederholten Verwendung von immobilisiertem Enzym ohne Regeneration des Polymers.

Es zeigte sich, dass die Verwendung wasserziehender Lösemittel den Verlust der Aktivität zur Folge hatten, was vermutlich auf einen Verlust von Wassermolekülen in der Hydrathülle des Enzyms und damit einhergehender Denaturierung dessen zurückzuführen ist. Nur die Verwendung von MTB-Ether und Essigsäureethylester führte zu keinem Aktivitätsverlust der immobilisierten Benzaldehydlyase. So wurde nach jedem Lauf das Harz mit 15 mL Essigsäureethylester gewaschen und im Anschluss durch

<sup>96</sup> U. T. Bornscheuer, K. Buchholz, *Eng. Life Sci.*, **2005**, *4*, 309 – 323.

Suspension im Reaktionspuffer wieder reaktiviert. Anschließend wurde das Harz ohne Regeneration mit Benzaldehydlyase erneut in einer Reaktion eingesetzt. Der Reaktionspuffer wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und das Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung gewonnen werden. Alle Reaktionen verliefen nahezu identisch, wie der Konzentrationsverlauf des Benzaldehyds während der Reaktionen zeigt (Abbildung 35). Lediglich der 4. Lauf verlief etwas langsamer, aber führte immer noch zum vollständigen Umsatz. Die Produkte der einzelnen Läufe wurden isoliert und die Ausbeuten betragen bei den Lauf 1, 2 und 4 >99 %, bei Lauf 3 waren es lediglich 86 %, was auf einen Fehler bei der Extraktion zurückzuführen war. Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass die Immobilisierung des Enzyms an der festen Phase auch eine Schutzwirkung für das Enzym gegenüber organischen Lösemitteln ausübt. Des Weiteren zeigt es, dass die Anwendungsmöglichkeiten für immobilisierte Enzyme erweitert werden können.

#### Mehrfachläufe mit immobilisierter BAL

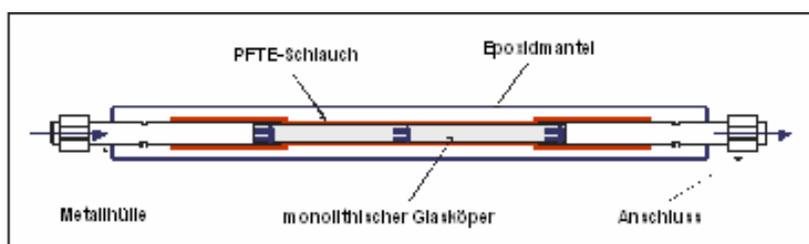


**Abbildung 35:** Verlauf der Benzaldehydkonzentration während der Umsetzung mit immobilisierter BAL - ohne Regeneration des Polymers mit Enzym.

Die Mehrfachverwendung von immobilisierten Enzymen stellt einen großen Vorteil bei der Betrachtung der Kosten von Umsetzung mit Enzymen dar. Sie eröffnet die Möglichkeit, Enzymreaktionen im Batchbetrieb mehrfach durchzuführen und somit eventuell für das Enzym schädliche Produkte aus der Reaktionsmischung zu entfernen, ohne den Verlust der Enzymcharge. Das Problem des mangelnden Abtransports des gebildeten Produktes von der polymeren Phase konnte gelöst werden und die Möglichkeit, größere Mengen Benzaldehyd umsetzen zu konnten so erschlossen werden. Wünschenswert war auch die Übertragung der hier entwickelten Methode auf die Anwendung von Durchflussreaktoren, welches Gegenstand der folgenden Untersuchungen war.

### 3.10 Vergleichende Untersuchung zur Enzymimmobilisierung auf PASSflow-Säulen

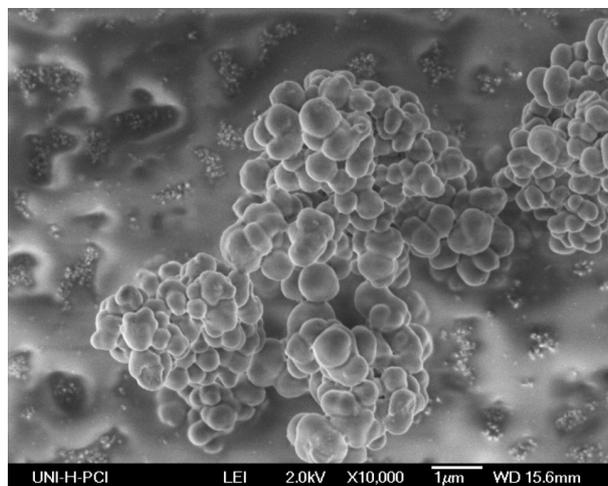
In Kapitel 3.6 wurde die Option überprüft, die IMAC auf das neu entwickelte Polymersystem zu übertragen. Hierbei zeigte sich, dass die neu entwickelte Phase im Vergleich zum etablierten Lysin-basierten Chelatlinker bessere Resultate in den Immobilisierungs- und Aufreinigungsfähigkeiten zeigte. Die so ausgearbeitete Methodik sollte auf die PASSflow-Technik übertragen werden, um die Verwendung von Enzymkatalysierten Reaktionen im Durchflussverfahren zu erproben. Als Durchflussreaktoren dienten ummantelte monolithisch strukturierte Säulen aus einem porösem Polymer/Glas-Kompositmaterial (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Schema einer monolithischen Polymer/Glas - Kompositsäule (PASSflow - Reaktor)

Das Polymer ist als ca. 1 µm große Polymerkugeln im Inneren eingebettet (Abbildung 37), an denen die Chelatlinker kovalent gekuppelt wurden. Die Reaktionslösungen wurden mit Hilfe von HPLC-Pumpen durch das in den Säulen befindlichen Mikrokanalsystem

gepumpt und ermöglichten so einen möglichst großen Kontakt zwischen Reaktanden und den heterogenisierten Katalysatoren<sup>97</sup>.



**Abbildung 37:** Aufnahme des Polymers vom Typ 3 mit dem Rasterelektronenmikroskop, 10000-fache Vergrößerung

Grundsätzlich bestanden zwei Möglichkeiten der Reaktionsführung. Die Umsetzung in einem einzigen Durchlauf der Reaktionslösung durch den Reaktor (continuous flow), sowie das kontinuierliche Durchpumpen der Reaktionslösung im Kreislauf (batch betrieb) (Abbildung 14). Um diese Methode für die Enzymkatalyse nutzen zu können, wurden die Polymere in den *PASSflow*-Säulen mit den beiden zu vergleichenden Linkersystemen beladen. Hierbei bestand keine Möglichkeit der gravimetrischen und spektroskopischen Überprüfung der Resultate (Kupplungen der Chelatlinker an das Polymer vom Typ 3, welches sich in der *PASSflow*-Säule befand). Es wurde daher bei der Beladung der Säulen mit den jeweiligen Linkern so vorgegangen, wie in den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 beschreiben. Um eine Verweilzeit gewährleisten zu können, die eine möglichst hohe Beladung der Polymermatrix ermöglichte, wurden die Reaktanden im Kreislauf bei 1.0 mL/min durch die *PASSflow*-Säule gepumpt. Sowohl die Säule selbst, als auch der Vorlagekolben konnten mittels eines Thermostaten auf die entsprechenden Reaktionstemperaturen geheizt werden. Die so mit den Ni-NTA-Linkern beladenen *PASSflow*-Säulen wurden vor der Beladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen mit Dichlordimethylsilan siliconisiert. Die Passivierung der Glassäule diente dazu, unspezifische Bindungen zwischen den Proteinen und den sich im Glas befindlichen Sauerstofffunktionen zu

---

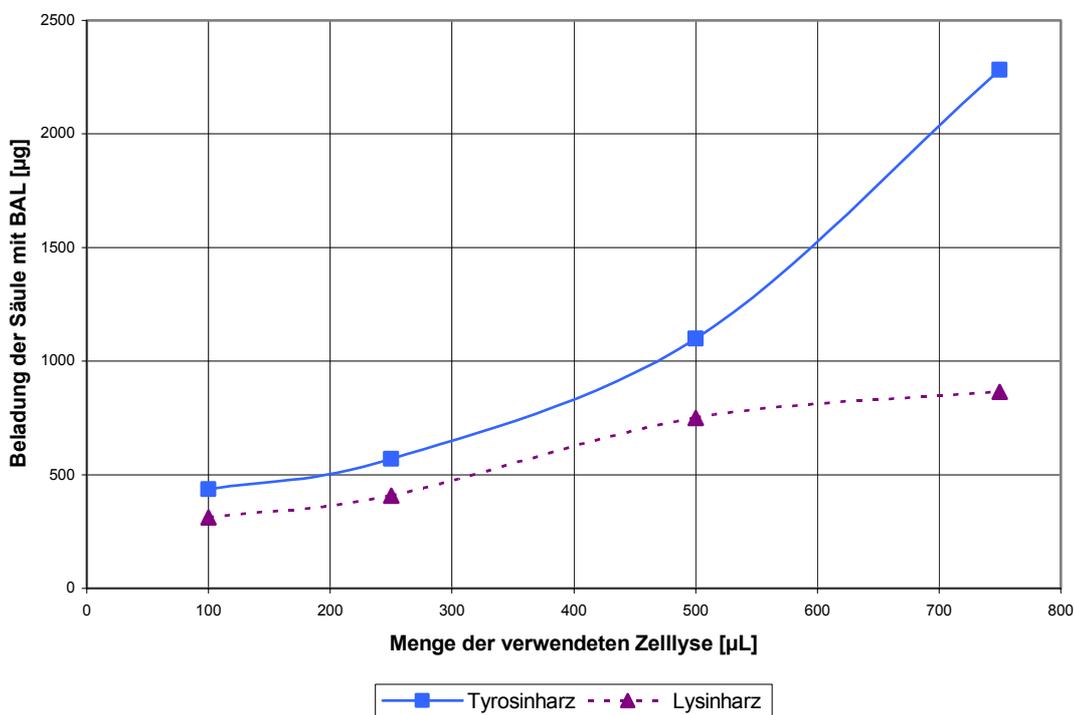
<sup>97</sup> A. Kirschning, C. Altwicker, G. Dräger, J. Harders, N. Hoffmann, U. Hoffmann, H. Schönfeld, W. Solodenko, U. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 3995 – 3998.

vermeiden. Wird dieser vorbereitende Schritt weggelassen, werden neben den spezifisch gebundenen Enzymen am Polymer auch große Mengen Proteine durch das Glas immobilisiert und eine Aufreinigung des entsprechenden Enzyms unmöglich gemacht. Diese Passivierung musste nur ein Mal durchgeführt werden und wirkte während sämtlicher Reaktionen.

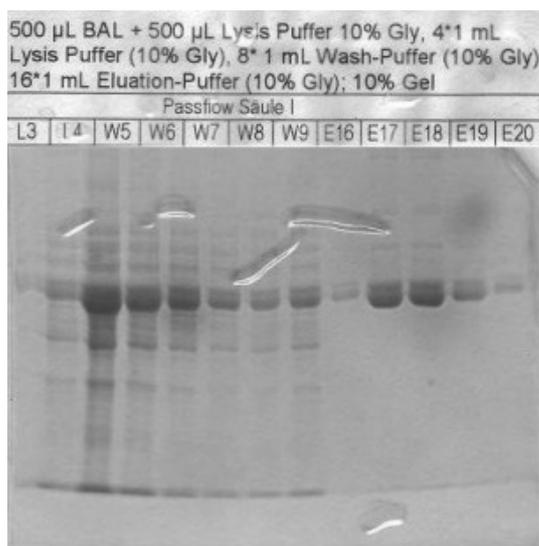
Die eigentliche Verifizierung der kovalenten Kupplung der Chelatliganden und deren Verseifung am Polymer erfolgte nach der Beladung mit  $\text{Ni}^{2+}$  über die im Folgenden beschriebene Immobilisierung und Aufreinigung der Benzaldehydlyase.

#### **3.10.1 Beladung der *PASSflow*-Säulen mit BAL**

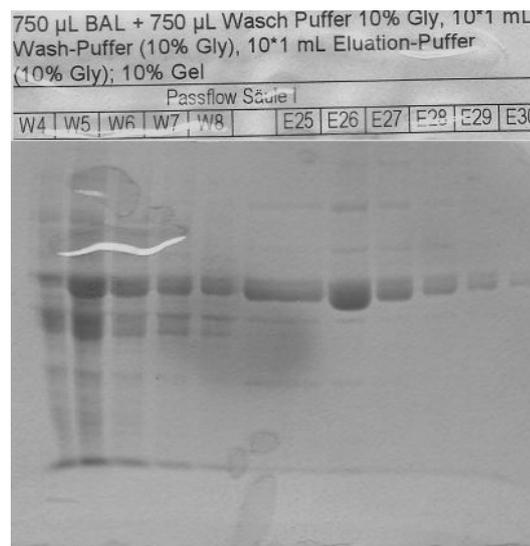
Wie in Kapitel 3.6 beschrieben, wurden die beiden zu vergleichenden Linkersysteme mit der BAL beladen. Die in den Säulen befindliche Menge an Polymer entspricht ca. 200 mg (1 mmol Cl) der in Kapitel 3.6 verwendeten Polymermenge. Es musste berücksichtigt werden, dass die *PASSflow*-Anlage ein Totvolumen von ca. 3 mL hat. Wie in Kapitel 9.3 beschrieben wurden die Säulen mit BAL beladen, gewaschen und das gebundene Enzym eluiert. Zur Bestimmung der immobilisierten Enzymmengen wurden mit den einzelnen Fraktionen Bradford-Assays durchgeführt. Die Beladungstests erfolgten wieder mit 100  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$  und 750  $\mu\text{L}$  Zellyse.

**Maximale Beladung der PASSflow - Säulen mit BAL****Abbildung 38:** Vergleich der Immobilisierungsfähigkeiten der beiden Chelatlinker.

Es wurde deutlich, dass die beiden Linkersysteme gute Immobilisierungseigenschaften für Fusionsenzyme besitzen. Der Tyrosin-Linker zeigte, wie bei den Versuchen mit den losen Harzen, auch hier eine höhere Kapazität für das Enzym, als das Lysin-basierte Linker-System. Die immobilisierten Enzymmengen lagen sogar höher als bei den entsprechenden Versuchen mit den losen Harzen (Kapitel 3.8). Dies wies auf eine Verbesserung der Wechselwirkung zwischen den chelatlierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen und den His<sub>6</sub>-tags, durch das Mikrokanalsystem, welches im Vergleich zu den losen Harzen einen größeren Oberflächenkontakt bietet, hin. Eine Kapazitätssteigerung könnte auch dadurch zustande gekommen sein, dass die Oberfläche der Polymerkugeln durch die Polymerisationsmethode im porösen Glasmonolithen größer ist. Die Durchleitung der Zelllyse durch das Mikrokanalsystem des PASSflow-Reaktors bewirkt einen größtmöglichen Kontakt zwischen den His<sub>6</sub>-tags und den Ni-Ionen, da hierbei eine wesentlich größere Oberfläche am Polymer direkt mit der Flüssigkeit in Wechselwirkung treten kann, was bei der Verwendung der losen Harze nicht gewährleistet werden kann. Auch die Überprüfung der Reinheit der immobilisierten Enzyme mittels SDS-Page bestätigte die für die losen Harze erhaltenen Daten (Abbildungen 39 und 40).

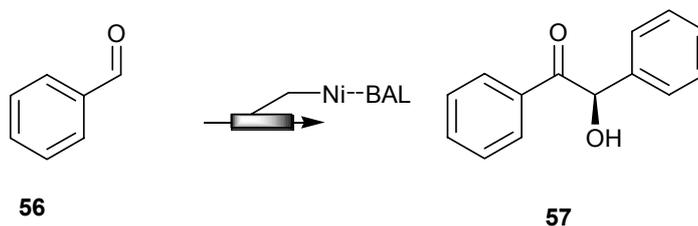


**Abbildung 39:** SDS-Page nach der Aufreinigung von BAL mittels PASSflow-Säule mit Lysinlinker 500 µl Zellyse



**Abbildung 40:** SDS-Page nach der Aufreinigung von BAL mittels PASSflow-Säule mit Tyrosinlinker 750 µl Zellyse

Somit konnte gezeigt werden, dass das Konzept der PASSflow-Mikroreaktoren für die IMAC genutzt werden kann und sogar bessere Immobilisationseigenschaften, bei gleich guter Aufreinigungsfähigkeit besitzt, als bei der Verwendung loser Harze. Es blieb zu überprüfen, ob sich dies auch auf die Umsetzung von Benzaldehyd mittels auf der PASSflow-Säule immobilisierter Benzaldehydlyase übertragen ließ. Hierzu wurden die PASSflow-Säulen frisch mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen und im Anschluss mit Benzaldehydlyase aus 750 µL Zellyse beladen.

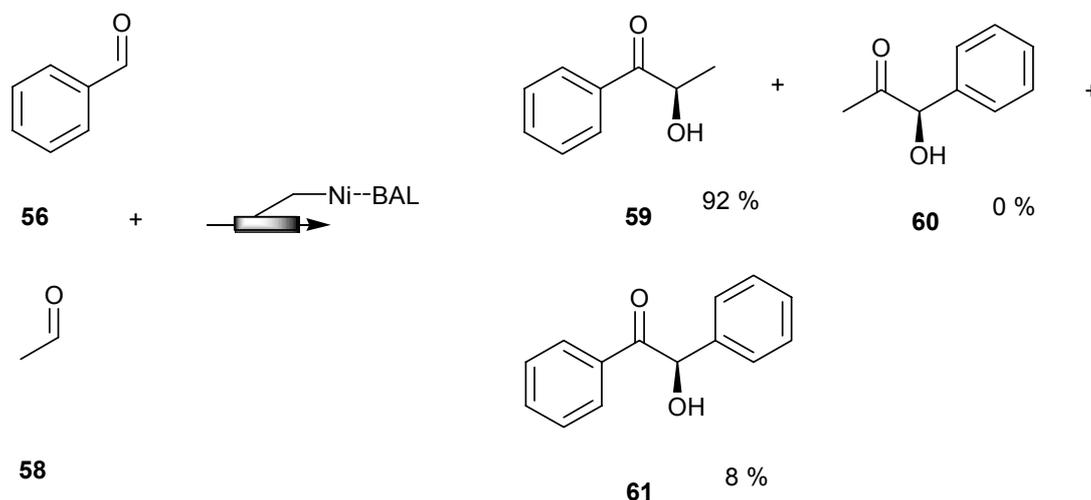


**Schema 8:** Umsetzung von Benzaldehyd zu Benzoin mittels Benzaldehydlyase immobilisiert auf der PASSflow-Säule bei 37°C

Anschließend wurde der Reaktionspuffer mit dem Benzaldehyd durch den Reaktor gepumpt (continuous flow) und die Reaktionsmischung nach der Säule aufgefangen. dünn-schichtchromatographische Untersuchungen ergaben, dass nach einem einzigen

Durchlauf der Reaktionsmischung kein Benzaldehyd mehr im Reaktionspuffer vorhanden war. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Das Produkt bedurfte keiner weiteren Aufreinigung. Die Ausbeute lag mit 65 % nicht im erwarteten Bereich. Nach Spülen der Säule mit Essigester konnten die fehlenden 35 % von der Säule eluiert werden. Auch hier wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, mehrere Reaktionen hintereinander ohne Regeneration des Reaktors mit frischem Enzym durchzuführen. Wiederum konnten die Ergebnisse aus den Studien mit dem losen Harz bestätigt werden. Es wurden 4 Läufe mit 30  $\mu$ L Benzaldehyd durchgeführt und in allen Fällen wurde nach einem einzigen Durchlauf durch den Reaktor vollständiger Umsatz zu Benzoin gefunden. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede bei den verwendeten Chelat-Linkersystemen. Da die Beladung der Reaktoren mit Benzaldehydlyase bei beiden Chelatlinkern für die umgesetzte Menge sehr hoch war, hätten sich Unterschiede erst bei deutlich größeren Benzaldehydmengen bemerkbar gemacht. Das Problem der Elution des Produktes in den Reaktionspuffer hatte diese Betrachtung jedoch erheblich erschwert. Zur Überwindung dieser Schwierigkeit wurde die Reaktion so verändert, dass das entstehende Produkt besser im Reaktionspuffer löslich war (Schema 9).

Für die nicht immobilisierte Benzaldehydlyase wurde die Fähigkeit zur Tolerierung verschiedener Donoren berichtet.<sup>98</sup> Hier sollte nun anhand der Kupplung von Benzaldehyd mit Acetaldehyd diese Möglichkeit ebenfalls für die Anwendung in der *PASSflow*-Säule überprüft werden.



**Schema 9:** Gekreuzte Acyloinkondensation von Acetaldehyd mit Benzaldehyd im *PASSflow*-Reaktor

<sup>98</sup> P. Dünkemann, D. Kolter – Jung, A. Nitsche, A. S. Demir, P. Siegert, B. Lingen, M. Baumann, M. Pohl, M. Müller, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12084 – 12085.

Hierbei wurde der Acetaldehyd im fünffachen Überschuss gegenüber dem Benzaldehyd eingesetzt. Wie erwartet wurde ein Teil des Benzaldehyds auch zu Benzoin umgesetzt, der weitaus größere Teil aber zum Kreuzkupplungsprodukt. Hierbei ist zu erwähnen, dass ausschließlich Verbindung **59** entstanden ist, bei der der Acetaldehyd als Acyldonor und der Benzaldehyd als Acylakzeptor fungierten. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich auch Kreuzkupplungen im PASSflow-Reaktor realisieren lassen. Da sich diese Umsetzung sowohl mit dem Chelatlinker auf Lysin-Basis als auch mit dem auf Tyrosin-Basis realisieren ließ, wurden alle weiteren Umsetzungen mit dem PASSflow-Reaktor mit dem Tyrosin-Linker durchgeführt.

### 3.11 Verwendung von Lipasen – immobilisiert auf PASSflow-Säulen

Lipasen sind vielseitig in der Organischen Chemie verwendete Enzyme, was durch eine Fülle von Publikationen zu diesem Thema belegt ist<sup>99</sup>. Sie dienen hauptsächlich zur (stereo-) selektiven Schützung bzw. Entschützung von Hydroxygruppen<sup>100</sup>. Dabei können auch sonst sehr schwer realisierbare Racematspaltungen tertiärer Alkoholgemische durchgeführt werden<sup>101</sup>. Zur Reaktion werden die Lipasen in Lösung oder immobilisiert<sup>102</sup> zu den Reaktanden gegeben.

#### 3.11.1 Immobilisierung von schon gereinigte Enzymen

Die hier verwendeten Lipasen aus *Bacillus subtilis* (BsubNBE), *Streptomyces diastatochromogenes* (SDE), *Pseudomonas fluorescens* (PFEI) wurden von der Arbeitsgruppe Bornscheuer et al. zur Verfügung gestellt. Zunächst sollte überprüft werden, ob sich diese gereinigten Enzyme unter den gleichen Bedingungen im PASSflow-Reaktor immobilisieren lassen. Dazu wurden sie zunächst in imidazolfreiem Puffer

---

<sup>99</sup> a) Y. Ishii, S. Nagumo, T. Arai, M. Akuzawa, N. Kawahara, H. Akita, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 716 – 725; b) T. Katoh, K.-I. Awasaguchi, D. Mori, H. Kimura, T. Kajimoto, M. Node, *Synlett*, **2005**, 19, 2919 – 2922.

<sup>100</sup> U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley- VCH, Weinheim **1999**.

<sup>101</sup> E. Henke, J. Pleiss, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3211 – 3213.

<sup>102</sup> F. Secundo, G. Carrea, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 3194 – 3199.

aufgenommen, anschließend mit der gleichen Menge Waschpuffer versetzt und auf die Säule geladen. Alle Pufferlösungen hatten einen Anteil von 10 % Glycerin, welches das Ausfallen des Enzyms in wässriger Lösung verhindern sollte. Anschließend durchgeführte Bradford-Assays zeigten, dass keines der Enzyme immobilisiert werden konnte. Es wurde vermutet, dass die Anwesenheit des Glycerins die Immobilisation stören könnte und so wurden Pufferlösungen ohne Glycerin verwendet. Dies brachte jedoch keinen entscheidenden Vorteil für die Immobilisation der Enzyme im Reaktor. Die Imidazolkonzentration, die während der Versuche zu Immobilisierung mit BAL auf 10 mM gesteigert wurde, wurde nun schrittweise reduziert (Tabelle 7)

Imidazolkonzentration im Beladungspuffer	Ergebnis
10.0 mM	keine Immobilisation
7.5 mM	keine Immobilisation
5.0 mM	keine Immobilisation
0.0 mM	Immobilisation

**Tabelle 7:** Optimierung der Beladung der PASSflow-Säule mit den gereinigten Enzymen - Variation der Imidazolkonzentration

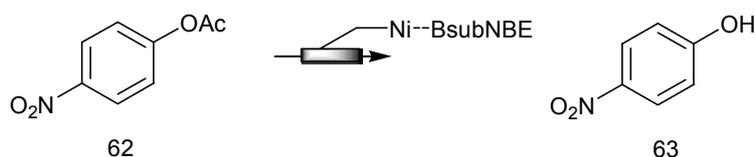
Erst die Verwendung eines imidazolfreien Beladungspuffers führte zur gewünschten Immobilisierung der Enzyme (Tabelle 8). Da es sich hierbei um gereinigte Enzyme handelt, war das Vorhandensein von Imidazol im Beladungspuffer nicht notwendig. Es traten keine unspezifischen Bindungen auf. Aus demselben Grund entfielen die Waschschritte bei der Beladung. Auch eine Bestimmung der Enzymreinheit mittels SDS-Gelelektrophorese war nicht notwendig. So konnte hier gleich zur Optimierung der Reaktionsbedingungen übergegangen werden.

Enzym	Beladung der PASSflow-Säule
para – Nitrobenzylesterase aus <i>Bazillus subtilis</i>	465 µg
Esterase aus <i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	408 µg
Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	456 µg

**Tabelle 8:** Beladungen des PASSflow-Reaktors mit den Lipasen

### 3.11.2 Überprüfung der Aktivität und des Leaching immobilisierter Lipasen

Erste Versuche zur Überprüfung der Enzymaktivität wurden mit *p*-Nitrophenylacetat durchgeführt (Schema 10). Verwendet wurde der gleiche Reaktionspuffer wie für die Umsetzungen mit Benzaldehydlyase.



**Schema 10:** Aktivitäts- und Leachingtest mit den Lipasen

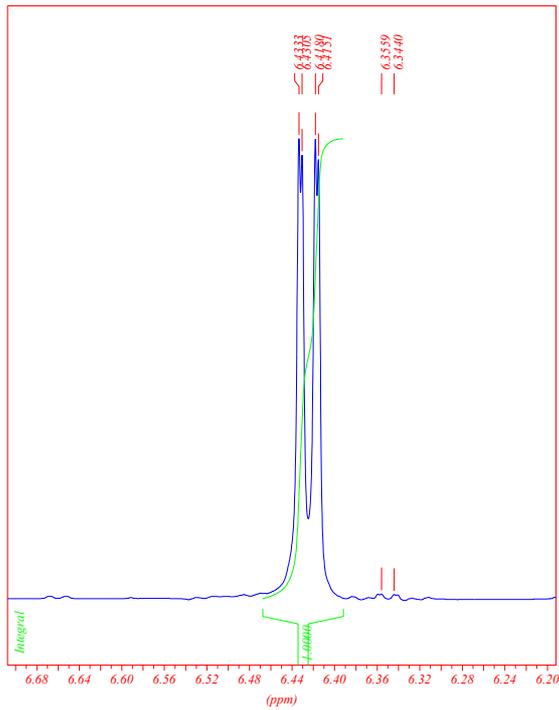
Hierbei wurden die Enzyme wiederholt vom im Reaktionspuffer vorhandenen DMSO eluiert. Dieser Umstand konnte durch Leachingtests, bei denen per HPLC die Verhältnisse von Edukt zu Produkt gemessen wurden, nachgewiesen werden. Dazu wurden gleichzeitig je zwei Proben aus dem Vorlagekolben entnommen. Eine der Proben wurde sofort per HPLC vermessen und die zweite noch eine Stunde bei 37 °C stehen gelassen. Zeigte sich in der zweiten Probe mehr Produkt, musste das Enzym eluiert worden sein. Nachdem dieses Problem hier erstmals aufgetreten ist, wurde nach alternativen Lösemitteln gesucht, die als Additiv zum Reaktionspuffer gegeben werden konnten, ohne das Enzym von der festen Phase zu lösen. Da sich bei den Umsetzungen mit der Benzaldehydlyase zeigte, dass MTB – Ether als Co-Solvens toleriert wurde, wurde dies auch hier überprüft und festgestellt, dass ein Leaching des Enzyms nicht mehr stattfand. Die Übertragung auf die *PASSflow*-Apparatur ließ sich ohne weitere Veränderungen durchführen. Auch hier zeigte sich nach Anpassung des Reaktionspuffers kein Leaching mehr. Die Enzyme wurden auch nicht von den sich in der Säule aufbauenden Scherkräften eluiert.

### 3.12 Umsetzungen mit immobilisierten Lipasen

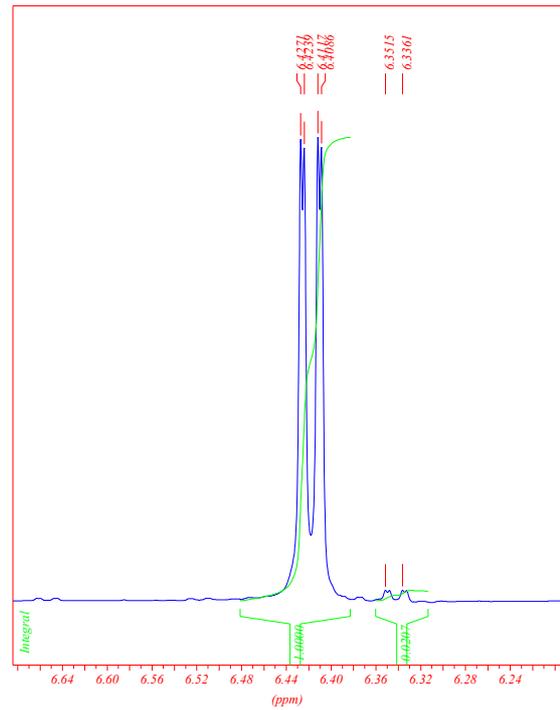
#### 3.12.1 Entschützung von Tri-O-acetyl-D-glucal

Zunächst sollte Tri-O-acetyl-D-glucal mit allen drei Enzymen umgesetzt werden. Hierzu wurde der *PASSflow*-Reaktor frisch mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladen. Es stellte sich als vorteilhaft heraus, die Beladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen nach jeder dritten Umsetzung mit einer Säule zu wiederholen, da durch das Eluieren des Enzyms mit dem Elutionspuffer, der einen pH von 8.0 aufweist, immer ein Teil der komplexierten Nickelionen in Nickelhydroxid umgewandelt wurden und Kapazitätsrückgänge der Säule zur Folge hatten. Im Anschluss wurde die Säule dem entsprechenden Enzym (5 mg) ausgesetzt, um maximale Beladung unter Durchflussbedingungen zu erreichen.

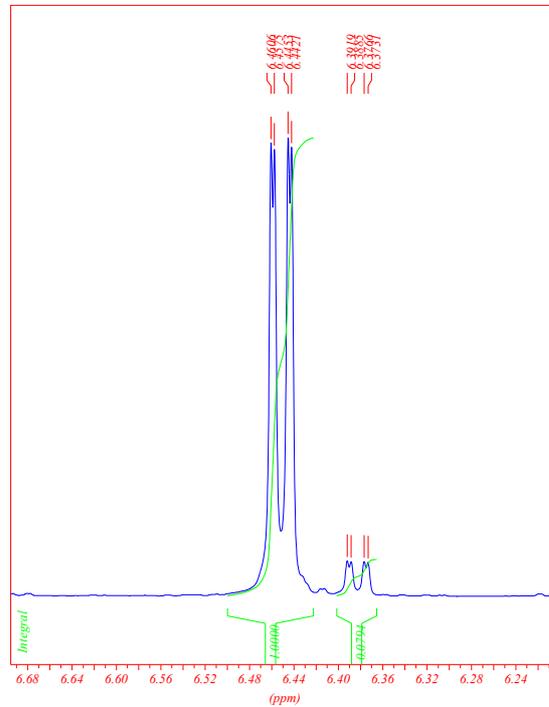
Zunächst wurde die Umsetzung von Tri-O-acetyl-D-glucal mit BsubNBE durchgeführt. Das Tri-O-acetyl-D-glucal wurde mit 1 mL/min durch den Reaktor gepumpt. Das entstandene Edukt-/Produktgemisch wurde mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Im Spektrum (Abbildung 41) zeigte sich neben den Signalen für das anomere Zentrum ein weiteres Signal, welches auf die Bildung einer neuen Verbindung hindeutete. Der Versuch wurde wiederholt und diesmal wurde die Pumpgeschwindigkeit auf 0.5 mL/min bzw. 0.1 mL/min reduziert. Die gemessenen Spektren (Abbildungen 42, 43) zeigten, dass das entsprechende Signal deutlich intensiver geworden ist. Die Pumpgeschwindigkeit und damit die Verweilzeit des Substrats im Reaktor waren, erwartungsgemäß für die Umsatzgeschwindigkeit von großer Bedeutung. Die Pumpgeschwindigkeiten konnten aufgrund der verwendeten Pumpe nicht beliebig gedrosselt werden. Für die weiteren Reaktionen, die im Kreislauf durchgeführt wurden, wurde eine Pumpgeschwindigkeit von 0.5 mL/min gewählt. Alle Umsetzungen von Tri-O-acetyl-D-glucal im Kreislauf wurden so lange durchgeführt, bis das Edukt in der Dünnschichtchromatographie nicht mehr nachzuweisen war.



**Abbildung 41:** Umsetzung von Tri-O-acetyl-D-glucal mit BsubNBE, single-pass, 1.0 mL/min

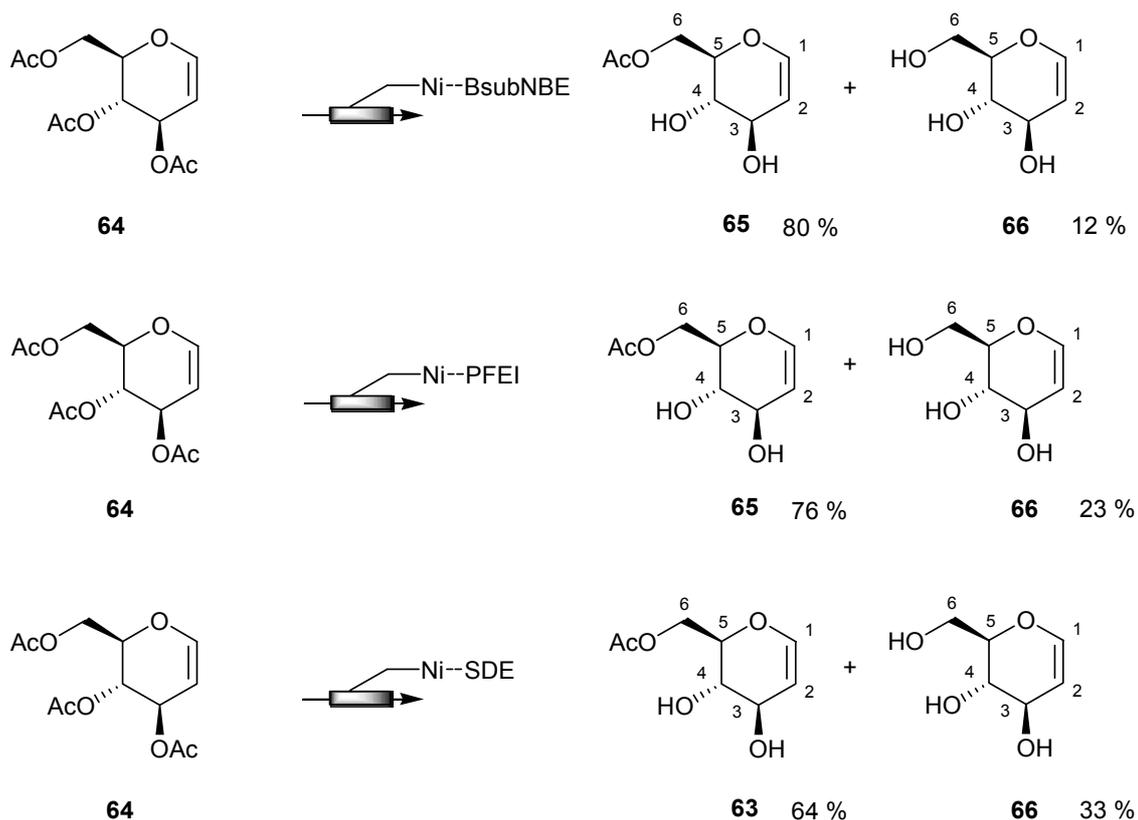


**Abbildung 42:** Umsetzung von Tri-O-acetyl-D-glucal mit BsubNBE, single-pass, 0.5 mL/min



**Abbildung 43:** Umsetzung von Tri-O-acetyl-D-glucal mit BsubNBE, single-pass, 0.1 mL/min

Es zeigte sich, dass alle drei Lipasen eine deutliche Selektivität zur Entschützung der sekundären OH-Gruppen besitzen. Obwohl sie für tertiäre Alkohole optimiert war, konnte bei der BsubNBE nach Isolation ein 5:1 Verhältnis der Verbindungen **65** und **66** beobachtet werden. Bei den anderen beiden Lipasen, die nicht für tertiäre Alkohole verwendbar waren, waren die Verhältnisse schlechter, aber die OH-Gruppe an Position 6 wurde trotz der größeren Aktivität als letztes entschützt. Das Edukt **64** konnte erst nach 45 – 60 Std. mittels Dünnschichtchromatographie nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Reaktionszeiten sind im Gegensatz zu den Umsetzungen in Lösung, welche als Kontrollexperimente durchgeführt wurden, durchaus deutlich länger. Bei den Vergleichsversuchen in Lösung hat die BsubNBE das Tri-O-acetyl-D-glucal innerhalb von 5 Minuten vollständig zu Verbindung **66** entschützt, mit den beiden anderen Enzymen erfolgte die Entschützung innerhalb von 30 - 45 Minuten. Hierbei waren keine Selektivitäten zwischen primären und sekundären OH-Gruppen zu erkennen.



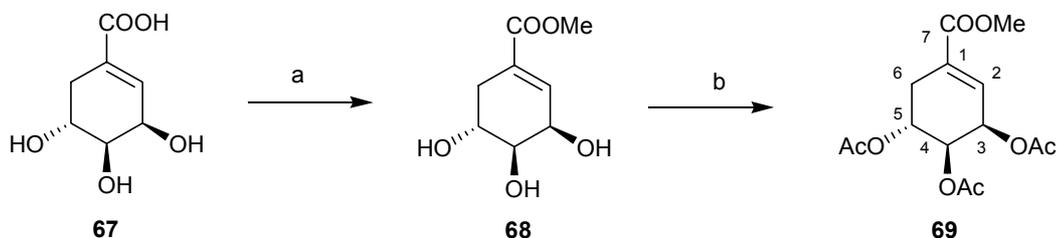
**Schema 11:** Deacetylierung von Tri-O-acetyl-D-glucal mit den verschiedenen Lipasen in der PASSflow-Säule

### 3.12.2 Umsetzungen von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester mit den Lipasen

Zur Überprüfung der mit dem Tri-O-acetyl-D-glucal erhaltenen Ergebnisse sollte noch ein anderes Polyol mit primären und sekundären Estergruppen getestet werden. Hierzu wurde die Shikimisäure ausgewählt, welche als 3,4,5-Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester eingesetzt werden sollte. Die Darstellung und Umsetzung wird im Folgenden beschrieben.

### 3.12.3 Darstellung von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester

Ein weiteres bekanntes und sehr interessantes Polyol ist Shikimisäure. Um die Umsetzung mittels der vorhandenen Lipasen testen zu können, musste diese verestert und an den freien Alkoholgruppen acetyliert werden (Schema 12). Hierzu wurde zunächst die Shikimisäure säurekatalysiert in Methanol zum Methylester umgesetzt, um anschließend ohne säulenchromatographische Aufreinigung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zum vollständig acetylierten<sup>103</sup> Produkt zu reagieren. Die Gesamtausbeute über zwei Stufen beträgt 74 %.

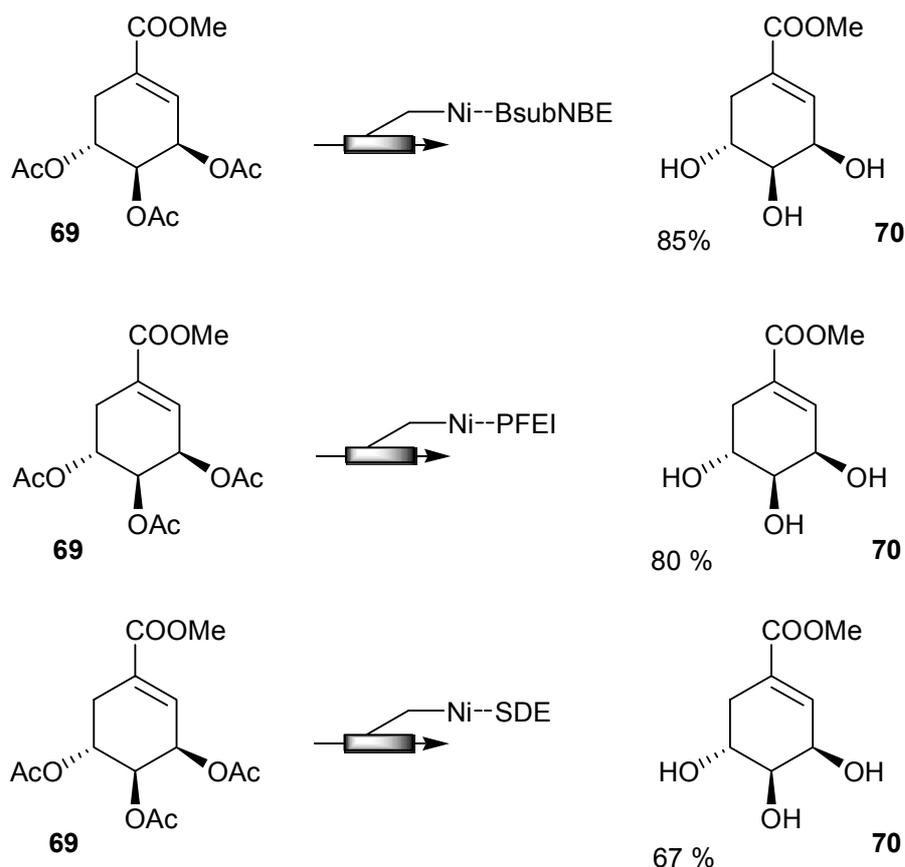


**Schema 12:** Reagenzien und Bedingungen: a) MeOH, *p*-Toluolsulfonsäure; b) Ac<sub>2</sub>O, Pyridin

<sup>103</sup> G. Ulibarri, W. Nadler, T. Skrydstrup, H. Audrain, A. Chiaroni, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 2753–2761.

### 3.12.4 Entschützung von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester mittels immobilisierter Lipasen

Nachdem die Umsetzungen von Tri-O-acetyl-D-glucal mit den Lipasen positiv verlaufen sind, sollte ein weiteres Substrat zur Verifizierung der Methode mit den immobilisierten Lipasen umgesetzt werden. Hierzu wird der *PASSflow*-Reaktor wieder frisch mit Nickelionen und für jede Umsetzung mit ca. 5 mg des entsprechenden Enzyms beladen. Die Reaktionsbedingungen werden von den Versuchen mit dem Tri-O-acetyl-D-glucal direkt übernommen. Die Reaktionen wurden Dünnschichtchromatographisch verfolgt. Erst nach einer Reaktionszeit von 55 - 60 Std. konnte ein einheitliches Ergebnis beobachtet werden. Als Ergebnis zeigte sich auch hier eine deutliche Selektivität gegenüber den sekundären Estern. Der Methylester wurde, wie erwartet, nicht angegriffen.



**Schema 13:** Deacetylierung von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester mit den verschiedenen Lipasen in der *PASSflow*-Säule

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein Durchflussreaktorsystem auf NTA-Basis aufgebaut werden. Hierzu wurde ein neues NTA-Linkersystem auf Basis von Tyrosin entwickelt. Dieses wurde vergleichend mit dem etablierten Lysinlinkersystem bezüglich der Immobilisierungskapazität für Fusionsenzyme mit His<sub>6</sub>-tag und deren Aufreinigung untersucht. Zudem fand eine Optimierung der polymeren Matrix bezüglich der Immobilisationsfähigkeit des NTA-Linkersystems und der Aktivität der immobilisierten Enzyme statt. Versuche zur Immobilisierung von Benzaldehydlyase aus der Zellyse waren mit beiden Linkersystemen erfolgreich, wobei das neu entwickelte Tyrosin-basierte Linker-System eine deutlich höhere Kapazität aufwies, als das zum Vergleich hergestellte Lysinlinkersystem. Auch die Reinheit des eluierten Enzyms, welche mittels denaturierender Gelelektrophorese bestimmt wurde, übertraf die des NTA-Systems auf Basis von Lysin.

Die mit dieser Methode immobilisierten Enzyme konnten ohne Elution direkt für chemoenzymatische Umsetzungen eingesetzt werden. So konnte mit aus der Zellyse immobilisierter Benzaldehydlyase Benzaldehyd zu (*R*)-Benzoin umgesetzt werden. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte gezeigt werden, dass eine starke Bindung des Proteins zur festen Phase vorliegt und kein Leaching stattfindet. Anfängliche Probleme beim Umsatz von größeren Mengen Benzaldehyd mit dem immobilisierten Enzym waren auf ein Transportproblem des Produkts von der festen Phase zurückzuführen. Es war möglich die mehrfache Nutzung des Proteins ohne Regeneration der festen Phase zu zeigen. Durch das Waschen des beladenen Polymers mit Essigsäureethylester - ohne Verlust der Enzymaktivität - konnte eine vierfache Wiederverwendung erreicht werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die immobilisierten Enzyme weniger leicht von organischen Lösemitteln in Ihrer Aktivität beeinträchtigt werden, als die entsprechenden Enzyme in Lösung.

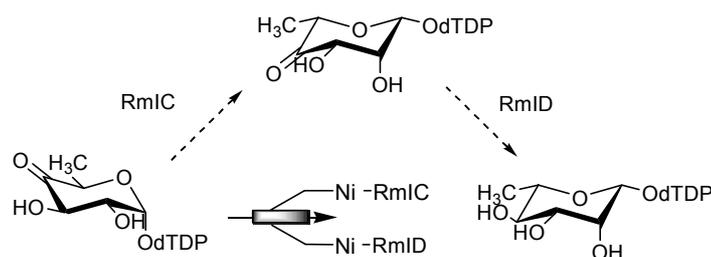
Auch die Übertragung der Technik auf das *PASSflow*-Reaktorsystem konnte realisiert werden. So konnte das NTA-Linkersystem im *PASSflow*-Reaktor aufgebaut werden und nach Passivierung des Reaktors, zur Vermeidung unspezifischer Immobilisierung von Enzymen am Glasrückgrat, erfolgreich selektiv Enzyme immobilisiert und aufgereinigt werden. Im Vergleich mit dem vorher getesteten losen Polymeren, zeigte sich im Reaktor eine größere Kapazität zur Enzymimmobilisierung. Da das Mikrokanalsystem der *PASSflow*-Säule keine Bypässe zulässt, ist die Kontaktfläche und damit die Wechselwirkung zwischen Ni-Ionen und His<sub>6</sub>-tag größer, als bei den vorher getesteten losen Polymeren. Auch hier zeigte sich, dass die Bindung zwischen den chelatlierten Ni-

lonen und den His<sub>6</sub>-tags der Enzyme sehr stark ist, so dass das Enzym während der gesamten Zeit auf dem Polymer verbleibt und nicht durch auftretenden Scherkräfte von der Matrix getrennt wird.

Auch die Anwendung der PASSflow-Technik bei unterschiedlichen Biotransformationen konnte gezeigt werden. So wurden neben der Benzaldehydlyase auch drei Lipasen auf den Säulen immobilisiert und, nach Anpassung der Reaktionsbedingungen auf das neue System, im Durchfluss eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der immobilisierten Lipasen im Vergleich zu den Versuchen in Lösung deutlich nachgelassen hat, aber eine stark erhöhte Selektivität festgestellt werden konnte. So wurden bei den Umsetzungen von Substraten die sowohl primäre als auch sekundäre Ester nebeneinander aufwiesen fast ausschließlich die sekundären Ester entschützt. Betrachtet man hingegen die gleichen Reaktionen in Lösung, ist keine Selektivität zu beobachten.

Auch die Bedeutung der Pumpgeschwindigkeit für den Reaktionsverlauf konnte untersucht werden. So wurde gezeigt, dass bei langsamen Pumpgeschwindigkeiten und damit verbundener längerer Verweilzeit der Substanzen im Reaktor ein höherer Umsatz erzielt wurde.

Zukünftig bleibt zu prüfen, ob auch komplexere Biotransformationen nach dem Vorbild von Wang *et al.*<sup>95</sup> in der PASSflow-Säule durchgeführt werden können. Aus zeitlichen Gründen konnte eine Transformation von 4-Keto-6TDP-Glucose mit zwei unterschiedlichen immobilisierten Enzymen nicht mehr durchgeführt werden. Die benötigten Plasmide für die His<sub>6</sub>-tag Fusionsenzyme wurden jedoch schon von der Arbeitsgruppe um L. Elling zu Verfügung gestellt und während dieser Arbeit exprimiert.



**Abbildung 44:** Umsetzung von 4-Keto-6-desoxy-dTDP-β-D-glucose zu dTDP-β-L-rhamnose im PASSflow-Reaktor

<sup>95</sup> J. Nahalka, Z. Liu, X. Chen, P. G. Wang, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 372 – 377.

Eine Limitierung von Biotransformationen stellt häufig die Notwendigkeit der Zugabe von Cofaktoren wie NADH dar. Da diese teuren Verbindungen zur Kostenreduzierung und damit der ökonomischen Nutzung von Enzymkatalysatoren enzymatisch regeneriert werden müssen, bleibt zu überprüfen, ob dieser Schritt auch im PASSflow-Reaktor möglich ist. Gelänge es, Enzyme für die Regeneration von NADH zusätzlich zu den Enzymen für die eigentliche Biotransformation auf einer Säule unter Beibehalt der Aktivität zu immobilisieren, wäre dies eine der wichtigsten Voraussetzungen für die kommerzielle Nutzung dieser Technik.

Nicht nur die Entschützung von acetylierten Alkoholen konnte mit dieser Methode durchgeführt werden. Auch die selektive Schützung von sekundären Alkoholen in Anwesenheit von primären in einem Organischen Lösemittel wie Toluol oder MTB-Ether sollte realisierbar sein. Krebsfänger *et al.*<sup>96</sup> zeigte derartige Umsetzungen mit an Celite immobilisierte PFEI. Eventuell auftretende Probleme mit der Löslichkeit der ungeschützten Substrate in diesen Lösungsmitteln kann durch die Verwendung eines Filters vor der Ansaugung der Pumpe behoben werden. Der gelöste Teil des Substrates wird dann in der PASSflow-Apparatur umgesetzt. Das Gleichgewicht der Reaktion müsste so auf die Produktseite verschoben werden.

Im Rahmen der Doktorarbeit von S. Hartlieb in unserer Gruppe sollen Derivate der Sialinsäure mittels der PASSflow-Technik in den entsprechenden CMP-Ester überführt und somit aktiviert werden.

Eine aus einer ganz anderen Richtung stammende Möglichkeit für den Einsatz der PASSflow-Technik könnte die Überprüfung von Enzyminhibition an immobilisierten Enzymen sein. Girelli *et al.*<sup>97</sup> führten analoge Arbeiten mit in HPLC-Säulen kovalent immobilisierten Enzymen durch. Diese Anwendung könnte sich auf die PASSflow-Technik übertragen lassen. Der Vorteil, den diese neue Technik mit sich bringen würde, wäre die Reversibilität der Enzymimmobilisierung. Damit könnten auf einer Matrix, die nicht nach den Tests entsorgt werden müsste, diverse unterschiedliche Enzyme mit einer Substanz auf Inhibition getestet werden.

---

<sup>96</sup> N. Krebsfänger, K. Schierholz, U. T. Bornscheuer, *J. Biotechnol.*, **1998**, *60*, 105 – 111.

<sup>97</sup> A. M. Girelli, E. Mattei, *J. Chrom.* **2005**, *819*, 3 – 16.

## 5 Einleitung

### 5.1 Antibiotika

Als Antibiotika (griechisch anti: gegen; biotikos: zum Leben gehörig) bezeichnet man Stoffe, die schon in geringen Konzentrationen die Vermehrung von Bakterien und Pilzen hemmen. Sie sind heute aus der Therapie von Infektionskrankheiten nicht mehr wegzudenken. Die meisten Antibiotika werden von Mikroorganismen produziert, vor allem von Bakterien der Gattung *Streptomyces* und einigen Pilzarten. Die Verwendung von verschimmeltem Brot oder Maisbrei für die topische<sup>98</sup> Wundbehandlung war schon in der Volksmedizin des alten Ägypten und China bekannt<sup>99</sup>. Auch indianische Naturvölker verfügten über das Wissen um die heilende Kraft antibiotischer Wirkstoffe. Erst mit der Entdeckung des Penicillin G durch Alexander Fleming 1929, und der Fermentation von *Penicillium rubrum* zur Produktion signifikanter Mengen durch Florey *et al.* 1940 wurde die wahre Bedeutung der Antibiotika sichtbar. Seit dieser Zeit wurden eine ganze Reihe unterschiedlicher antibiotischer Wirkstoffe unterschiedlichster Substanzklassen (Abbildung 45a und b) entdeckt und entwickelt<sup>100</sup>.

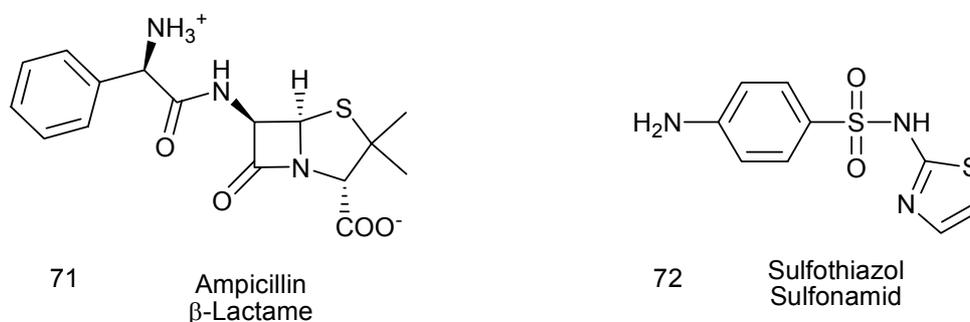


Abbildung 45a: Wichtige Substanzklassen der Antibiotika, Teil 1

<sup>98</sup> örtlich, lokal

<sup>99</sup> A) E. P. Abraham, *Antibiotics Containing  $\beta$ -Lactam Structure*, New York, Springer, **1983**, Bd 1, 1– 14; b) J. J. Hlavka, J. H. Boothe, *The Tetracyclines*, New York, Springer, **1985**.

<sup>100</sup> G. Habermehl, P. Hammann, *Naturstoffchemie, Eine Einführung*, Springer Verlag, Berlin **1992**.

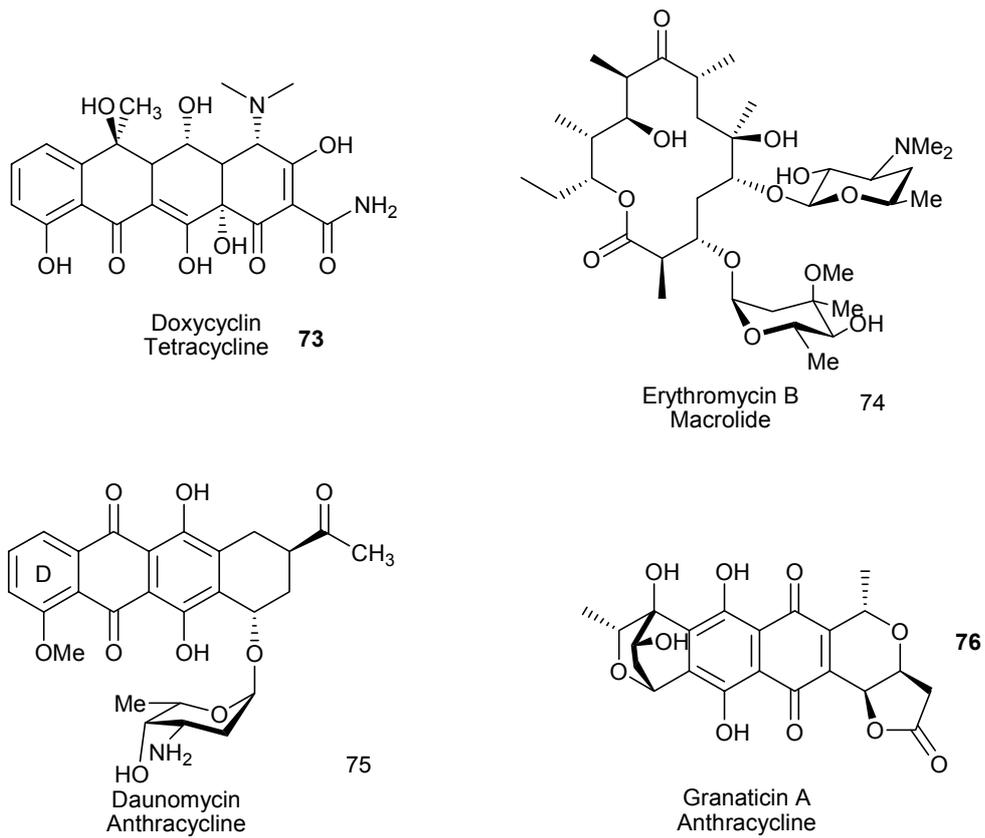


Abbildung 45b: Wichtige Antibiotikaklassen Teil 2

Die verschiedenen Substanzklassen haben unterschiedliche Angriffspunkte im bakteriellen Stoffwechsel. (Abbildung 46).

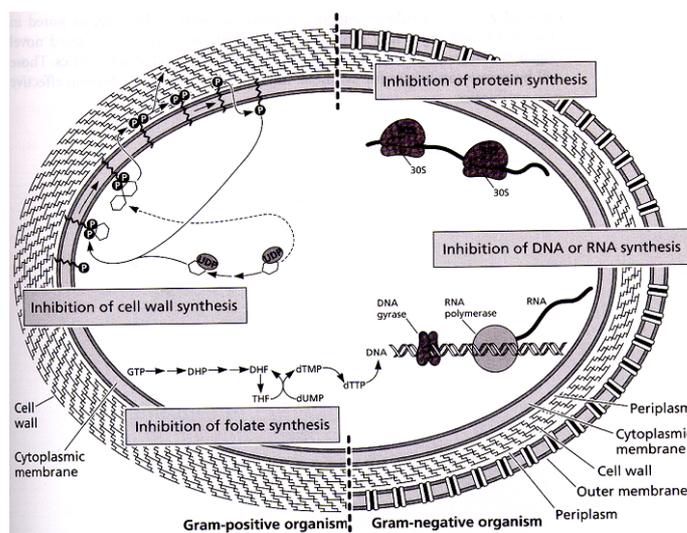


Abbildung 46: Wichtigste Angriffspunkte von Antibiotika in der Bakterienzelle<sup>101</sup>

<sup>101</sup> Vorlesung Medizinische Chemie, Universität Hannover, Prof. G. Benz, WS 2003/2004

So greifen sie unter anderem in die Folsäuresynthese der Zelle (Sulfonamide **72**) und in die Zellwandsynthese ( $\beta$  – Lactam – Antibiotika **71**) ein. Sie hemmen die Translation an unterschiedlichen Punkten (Tetracycline **73**, Aminoglycoside, Makrolide **74**, Chloramphenicol), lagern sich in die DNA ein und verhindern so die Replikation und Transkription (Anthracycline **75**). Im Folgenden wird nur näher auf die cytotoxischen Wirkungen von einigen Antibiotika eingegangen, da das in dieser Arbeit bearbeitete Antibiotikum Granaticin **76** hauptsächlich diese Wirkung aufweist. Die Wechselwirkungen mit der DNA und die daraus resultierende Cytotoxizität macht es schwierig, solche Substanzen als Antiinfektiva einzusetzen, da die DNA-schädigende Wirkung nicht ausschließlich auf den zu bekämpfenden Mikroorganismus beschränkt bleibt, sondern auch DNA der Patienten angreift. Diese Cytotoxizität und damit die einhergehenden Nebenwirkungen werden nur für die Therapie von lebensbedrohlichen Krankheiten wie Krebs in Kauf genommen.

## 5.2 Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und DNA

In Abhängigkeit vom Wassergehalt kann die doppelsträngige DNA in verschiedenen Konformationen vorliegen. Die dabei häufigste Form ist die B-DNA. Hierbei liegen zwischen den Rückgraten der beiden Einzelstränge zwei unterschiedlich breite Furchen vor. Die kleine Furche ist häufig der Bindungsort für Wirkstoffe. Kanzerostatisch wirksame Antibiotika können mit der DNA auf verschiedenen Wegen in Wechselwirkung treten. Dabei gibt es grundsätzlich unterschiedliche Methoden der Interaktion zwischen Wirkstoff und DNA. So können durch kovalente Bindungen zur DNA oder deren Alkylierung Strangbrüche induziert und RNA-Polymerasen oder Enzyme der DNA-Replikation, wie z. B. die Topoisomerasen inhibiert werden. Außerdem gibt es die Möglichkeit der nichtkovalenten Interaktion mit der DNA und interkalierende Substanzen, die sich in die DNA einlagern und damit deren Struktur verändern<sup>102</sup>. Im Folgenden wird exemplarisch auf einige Mechanismen der DNA-Interaktion eingegangen.

---

<sup>102</sup> a) A. Rabbani, R. M. Finn, J. Ausió, *BioEssays*, **2005**, 27, 50 – 56; b) C. Temperini, L. Messori, P. Orioli, F. Animati, G. Ughetto, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 1464 – 1469.

### 5.2.1 Kovalente Bindungsbildung und Strangbruchinduzierende Interaktionen mit der DNA

Eines der potentesten DNA-Alkylierungsmittel ist das (+)-Yatakemycin **77**.<sup>103</sup> Es besitzt die Besonderheit von zwei DNA-Bindungsstellen in Nachbarschaft zur alkylierenden Position im Molekül. Bevorzugt bindet es in Adenin- **78** und Thymin- **79** -reichen Regionen der DNA, dort bildet es ein „Sandwich“<sup>104</sup> in der kleinen Furche der DNA aus, in dessen Mitte die DNA selbst sitzt. Diese greift nucleophil den Cyclopropylring am Pyrrolindolsegment an<sup>105</sup>. Der so gebildete DNA-Komplex **80** ist irreversibel. (Abbildung 47).

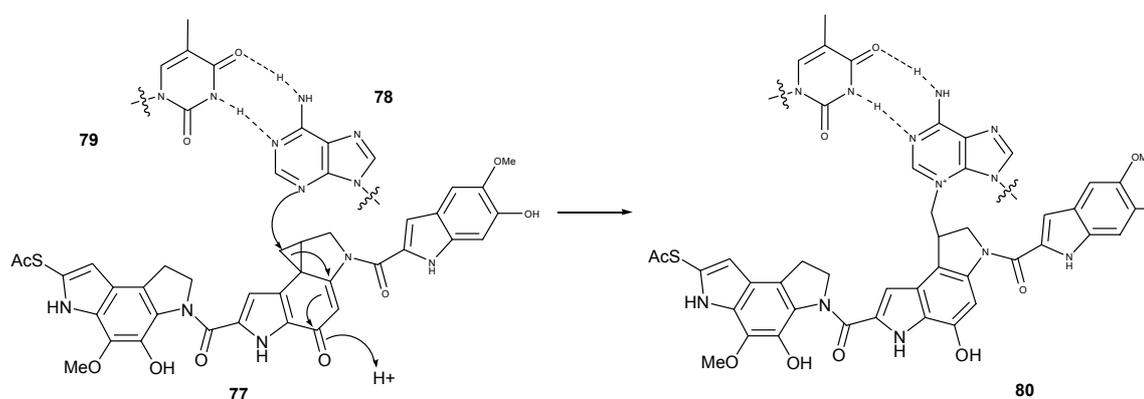


Abbildung 47: (+)- Yatakemycin alkyliert irreversibel die DNA

Für aromatische C-Glycoside wie das Aquayamycin (**81**) werden andere Mechanismen der DNA – Alkylierung postuliert<sup>106</sup>. Dabei wird der Aromat in der Zelle zum Hydrochinon **82** reduziert und ist so in der Lage die DNA zu alkylieren. (Abbildung 48).

<sup>103</sup> Y. Igarashi, K. Futamata, T. Fujita, A. Semine, H. Senda, H. Naoki, T. Furumai, *J. Antibiot.*, **2003**, 56, 107 – 113.

<sup>104</sup> J. P. Parrish, D. B. Kastinsky, S. E. Wolkenberg, Y. Igarashi, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 10971 – 10976.

<sup>105</sup> a) M. Freccero, R. Gandolfi, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 6202 – 6213; b) D. L. Boger, R. M. Garbaccio, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 1043 – 1052.

<sup>106</sup> a) H. W. Moore, R. Czerniak, *Med. Res. Rev.*, **1981**, 1, 249 – 280; b) H. W. Moore, R. Czerniak, A. Hamdan, *Drugs Exptl Clin. Res.*, **1986**, XII, 475 – 494.

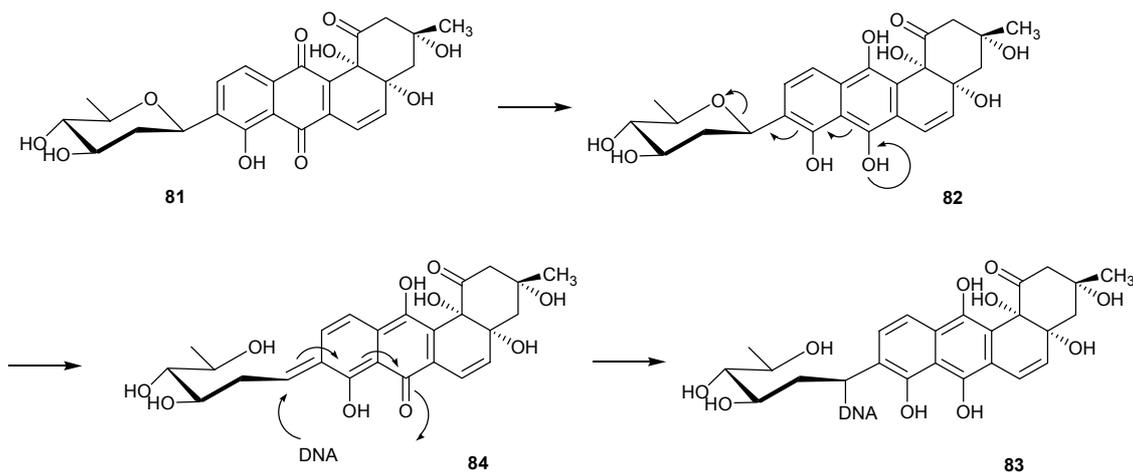


Abbildung 48: Alkylierung der DNA durch Aquayamycin

### 5.2.2 Interkalation in die DNA

DNA Interkalatoren haben durch ihr therapeutisches Potenzial als Antitumormittel große Aufmerksamkeit erregt<sup>107</sup>. Es handelt sich meist um flache aromatische Ringsysteme, die sich zwischen die Basenpaare der DNA einlagern können (Abbildung 49). Dort können sie als Inhibitoren der Topoisomerasen I und/oder II fungieren<sup>108</sup>. Die sich bildenden Komplexe sind oft sehr stabil. Durch die positive Ladung in den Verbindungen erfolgt zunächst eine sehr schnelle Assoziation mit dem DNA-Rückgrat. Anschließend erfolgt im zweiten Schritt der Bindung die Interkalation.

Eine herausragende Bedeutung haben vor allem das Daunomycin (**75**) und das Echinomycin (**83**) (Abbildung 50) als Vertreter unterschiedlicher Interkalatoren.

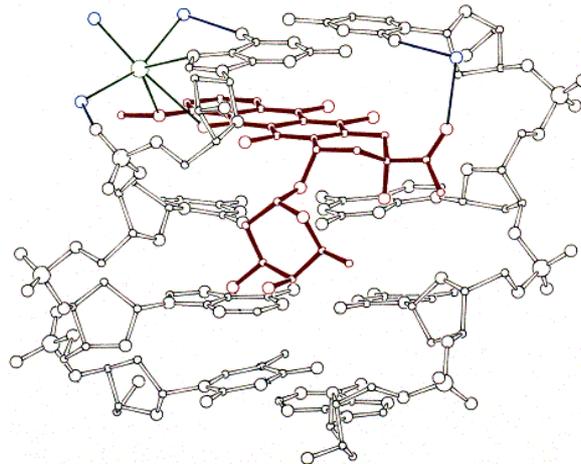
Daunomycin interkaliert nur an einer Stelle, während das Echinomycin durch seine Molekülstruktur in der Lage ist an zwei dicht beieinander liegenden Bindungsstellen Komplexe mit der DNA zu bilden<sup>109</sup>. Dadurch weist es eine deutlich höhere Affinität zur DNA auf als Daunomycin<sup>110</sup>.

<sup>107</sup> E. D. D. Kochevar, Dunn in *Bioorganic Photochemistry*, Wiley, New York, **1990**, 273 – 283.

<sup>108</sup> J. B. Laursen, J. Nielsen, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 1663 – 1686.

<sup>109</sup> F. Leng, J. B. Chaires, M. J. Waring, *Nucl. Acid Res.*, **2003**, *31*, 6191 – 6197.

<sup>110</sup> P. Yang, Q. Yang, X. Qian, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 11895 – 11901.



**Abbildung 49:** Kristallstruktur von Daunomycin (dunkelrot) interkaliert in die DNA von der kleinen Furche aus gesehen

In Abbildung 49 ist die Interkalation von Daunomycin dargestellt. Das flache aromatische Gerüst hat sich zwischen die Basenpaare eingelagert. Der Ring D des Naturstoffes liegt in der großen Furche und der Zucker füllt die kleine Furche aus. Hier gibt es durch die positive Ladung an Position 3 des Zuckers eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphat-Rückgrat. Die Bindungsstärke resultiert aus den Wechselwirkungen mit den Basen und zusätzlichen Wasserstoffbrücken<sup>111</sup>. Dadurch wird die DNA an dieser Stelle entwunden und der Abstand zwischen den Basenpaaren vergrößert sich<sup>112</sup>. Die Folgen sind drastische Veränderungen der DNA-Struktur. Sie führen zu Blockierung der Matrizenaktivität bestimmter DNA-Bereiche sowie zu Rastermutationen. Sogar Strangbrüche (sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche) treten auf. Sie sind auf konformative Verspannungen und unvollständig ablaufende Neusynthese- und Reparaturprozesse zurückzuführen<sup>113</sup>.

<sup>111</sup> a) S. Neidle, L. H. Pearl, J. V. Skelly, *Biochem. J.*, **1987**, 243, 1 – 13; b) B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1995**, 24, 463 - 493.

<sup>112</sup> J. E. Coury, I. L. McFail, L. D. Williams, L. A. Bottomley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 12283 – 12286.

<sup>113</sup> a) S. Neidle, *Antibiotic Affecting DNA Function in Chemotherapeutic Strategy*, London, Macmillan Press, **1983**, 3 – 23; b) D. E. V. Wilman, *The Chemistry of Antitumor Agents*, London, Chapman and Hall, **1990**.

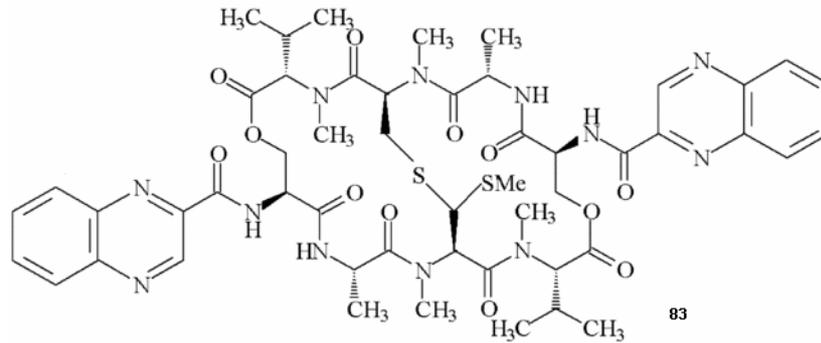


Abbildung 50: Struktur von Echinomycin

### 5.2.3 Inhibitoren der Ribonucleinsäurebiosynthese

Eine klare Unterscheidung der Wirkung eines DNA-aktiven Antibiotikums auf die DNA und den eigentlichen Effekt auf eines der relevanten Polymerisationsenzyme ist nur schwer zu treffen<sup>114</sup>. Alle Veränderungen der DNA, ob Alkylierung, Interkalation, Crosslinking oder anderweitige Manipulation der Strukturen der DNA-Doppelhelix wirken sich letztendlich auf mindestens eines der für den Zellzyklus relevanten Enzyme (Topoisomerase I und II, RNA-Polymerase)<sup>115</sup> aus. Während der Transkription bildet die RNA-Polymerase mit der DNA einen Komplex. Bei der folgenden Elongation bewegt sich die RNA-Polymerase an der DNA entlang, bis zur Terminationssequenz. Kann die DNA aufgrund von Komplexbildung oder Crosslinking nicht entwunden werden, kann sie nicht als Matrize dienen und eine Bildung der für die Proteinbiosynthese essentiellen m-RNA findet nicht oder nur unvollständig statt. Auch bei der Alkylierung der DNA, kann die RNA-Polymerase nicht ungehindert die DNA entlang „wandern“. Durch Komplexbildungsexperimente mit DNA-Fragmenten und Glykokonjugaten, welche mittels hochauflösender NMR-Spektroskopie untersucht werden, kann Aufschluss über spezifische Bindungen eines Wirkstoffs an die DNA gewonnen werden<sup>116</sup>. Diese Untersuchungen machen eine Unterscheidung der Behinderung der Proteinbiosynthese durch die Inhibition eines dafür

<sup>114</sup> U. Gräfe, *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, **1992**.

<sup>115</sup> a) A.L. Bodley, L. F. Liu, *Bio/Technol.*, **1988**, 6, 1315 – 1319; b) A. Sukanova, J. Devy, M. Pluot, J.-C. Bradley, J.- P. Vigneron, J.- C. Jardillier, J.- M. Lehm, I. Nabiev, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 1255 – 1268; c) V. S. Simonova, A. V. Samusenko, N. A. Filippova, A. N. Tevyashova, L. S. Lyniv, G. I. Kulik, V. F. Chekhun, A. A. Shtil', *Bull. Exp. Biol. Med.*, **2005**, 139, 455 – 459.

<sup>116</sup> D. R. Hare, D. E. Wemmer, S. H. Chou, G. Doubny, *J. Mol. Biol.*, 1983, 171, 319 – 336.

zuständigen Enzyms oder durch Wechselwirkung des Wirkstoffs mit der DNA selbst möglich.

### 5.3 Granaticin

Granaticin wurde erstmals 1957 aus *Streptomyces olivaceus* von der Arbeitsgruppe um H. Zähler isoliert<sup>117</sup>. Im Laufe der Zeit wurde es auch in diversen anderen Streptomycetenstämmen z. B. *Streptomyces violaceoruber* neben Granaticin B (**84**) nachgewiesen<sup>118</sup>. Granaticin gehört zu Klasse der Benzoisochromanchinone, zu der auch Kalafungin<sup>119</sup> (**85**), Actinorhodin<sup>120</sup> (**86**) und Nanaomycin<sup>121</sup> (**87**) zählen. Es zeigt Aktivität gegen Gram – positive Bakterien, jedoch keine oder nur geringe gegen Gram – negative Bakterien, Mycobakterien, Pilze oder Hefen.<sup>122</sup> Granaticin ist cytotoxisch weist Aktivität gegen eine Leukämiezelllinie<sup>123</sup> auf. Es inhibiert die RNA-Synthese und interagiert mit der Leucyl-RNA-Synthetase<sup>124</sup>, wodurch es die Beladung der Leucyl-tRNA verhindert und so die Elongation während der Proteinbiosynthese blockiert. Des Weiteren beruht die cytotoxische Wirkung von Granaticin A auf der Inhibition der Entwicklung der ribosomalen RNA.<sup>125</sup>

---

<sup>117</sup> R. Carbaz, L. Ettliger, E. Gäuman, J. Kalvoda, W. Keller – Schierlein, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta*, **1957**, *40*, 1262 – 1269.

<sup>118</sup> S. Barcza, M. Brufani, W. Keller – Schierlein, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta*, **1966**, *49*, 1736-1740.

<sup>119</sup> H. Hoeksema, W. C. Krüger, *J. Antibiot.*, **1976**, *29*, 704 – 709.

<sup>120</sup> H. Brockmann, A. Zeeck, K. van der Merwe, W. Müller, *Justus Liebings Ann. Chem*, **1966**, *696*, 145 – 159.

<sup>121</sup> a) H. Tanaka, Y. Koyama, T. Nagai, H. Mamuro, S. Omura, *J. Antibiot.*, **1975**, *28*, 868 – 875. b) S. Omura, H. Tanaka, Y. Okada, H. Mamuro, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1976**, 320 - 321.

<sup>122</sup> P. Soong, Y. Y. Jen, Y. S. Hsu, A. A. Au, *Taiwan Sugar Exp. Stn.*, **1964**, *34*, 105 – 107; b) T. Krzywy, M. Mordarski, B. Orłowska, A. Tkaczowa ; *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **1969**, *17*, 54 - 63.

<sup>123</sup> C.- J. Chang, H. G. Floss, P. Soong, C.-j. Chang, *J. Antibiot.*, **1975**, *28*, 156 – 156.

<sup>124</sup> a) C. E. Snipes, C.- j. Chang, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 701 – 706;

<sup>125</sup> P. Heinstejn, *J. Pharm. Sci.*, **1982**, *71*, 197 – 200.

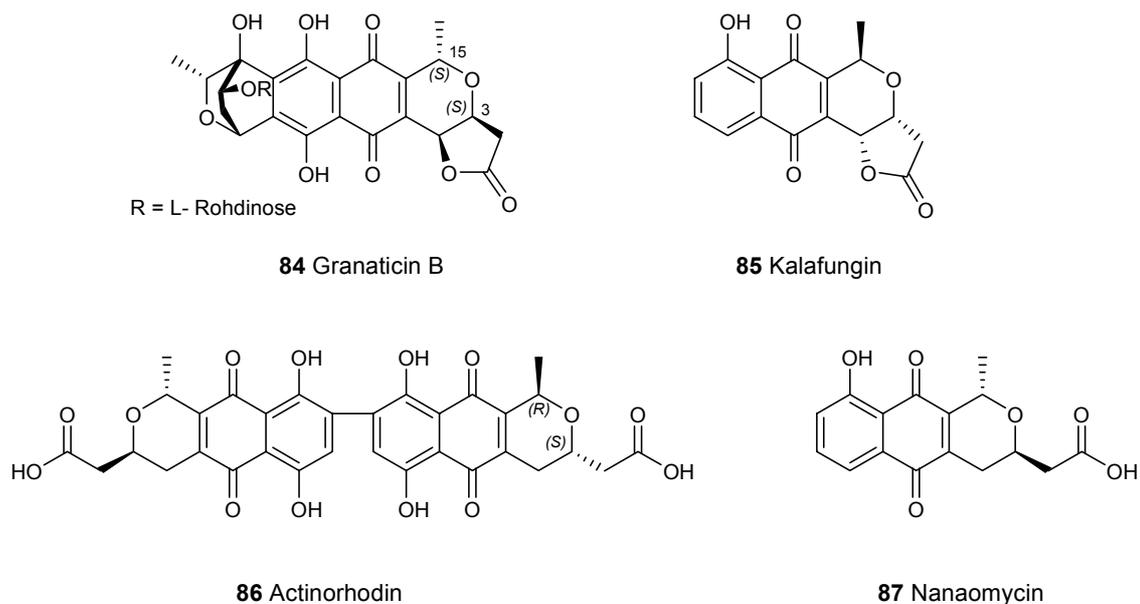


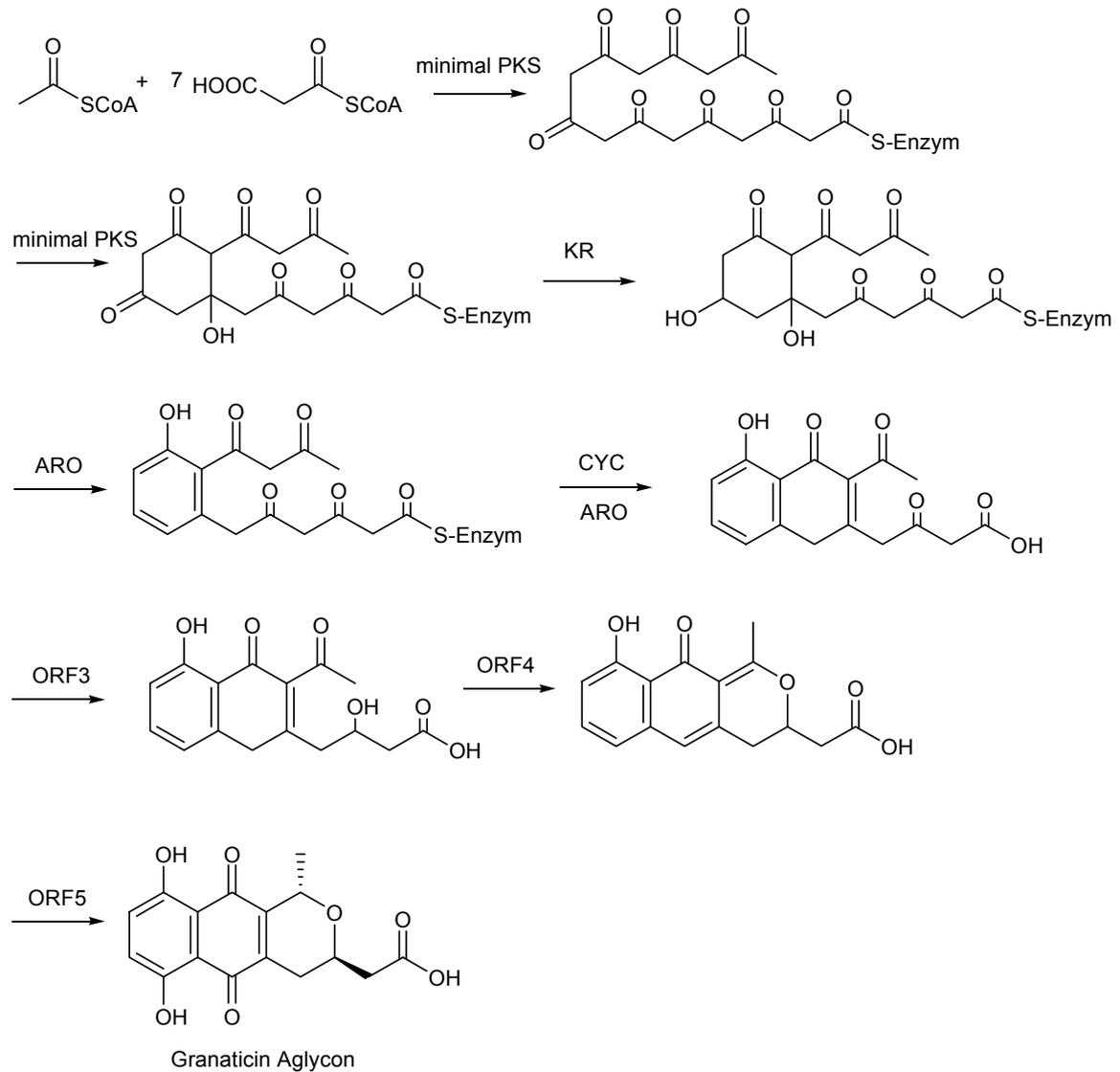
Abbildung 51: Benzoisochromanchinone

### 5.3.1 Biosynthese von Granaticin

Die Biosynthese des GranaticinGrundgerüsts entspricht der des Actinorhodins weitestgehend, mit der Ausnahme der Stereochemie an den beiden Stereozentren (C-3 und C-15). Das aromatische Grundgerüst von Granaticin wird aus sieben Malonateinheiten und einer Acetateinheit, über eine Polyketidsynthese (PKS) Typ II<sup>126</sup>, gebildet. Dabei handelt es sich um einen Multienzymkomplex, aus eigenständigen monofunktionalen Proteinen. Dieses ist für den Aufbau der Polyketonkette verantwortlich. Dieses als minimal-PKS bezeichnete Enzym fügt die sieben Malonateinheiten an die Startereinheit (Acetyl-CoA) an. So dass im Anschluss das komplette Kohlenstoffgerüst des Aglycons vorliegt. Verschiedene Post-PKS Transformationen geben dem Molekül seine spätere Struktur. Das Zusammenspiel der verschiedenen Kettoreduktasen, Aromatasen, Cyclasen und Oxygenasen bildet letztendlich das Aglycon von Granaticin<sup>127</sup>.

<sup>126</sup> F. Malpartida, D. A Hopwood, *Nature*, **1984**, 309, 462-464 c) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.*, **2001**;18, 777 – 779; d) D. A. Hopwood, D. H. Sherman, *Annu. Rev. Genet.*, **1990**, 24, 37 – 66; e) D. A. Hopwood, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 2465 – 2497.

<sup>127</sup> B. J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, 16, 425 – 484.



minimal PKS: Ketosynthase , Ketosynthase und das Acyl carrier protein

KR: Ketoreduktase

ARO: Aromatase

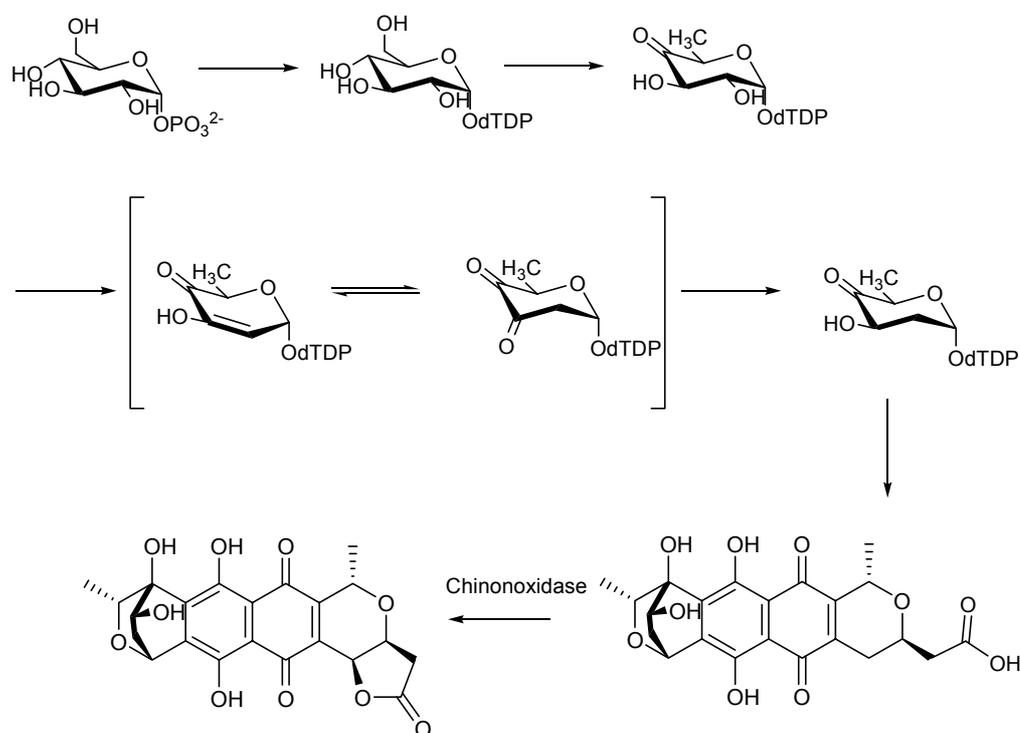
CYC: Cyclase

ORF: open reading frame - noch nicht endgültig zugeordnet

**Abbildung 52:** Biosynthese des Aglycons

Die Bildung der absoluten Konfigurationen an C-3 und C-15 ist nicht abschließend verstanden. Bei Vergleichstudien der Gencluster für die Bildung von Actinorhodin und Granaticin fanden sich, für die vermutlich für Stereochemie verantwortlichen Gene von

Actinorhodin<sup>128</sup>, keine Entsprechungen im Granaticingenluster.<sup>129</sup> Für die Reduktion und damit die Bildung des Stereozentrums an C-3 gibt es inzwischen einen Kandidaten im Gencluster von Granaticin<sup>130</sup>. Dabei handelt es sich um eine Alkoholdehydrogenase, die die Stereochemie an C-3 etabliert. Die Suche nach einem Protein, welches die Stereochemie an C-15 bestimmt wird zur Zeit von Arbeitsgruppe um K. Ichinose behandelt, der großen Anteil an der bisherigen Aufklärung der Biosynthese von Granaticin hatte. Auch der Zeitpunkt der Einführung der Hydroxygruppe an Position 8 ist noch nicht abschließend geklärt. So kann sie sowohl vor der Verknüpfung mit der Zuckereinheit, als auch danach eingefügt werden. Eine der ungewöhnlichen strukturellen Eigenschaften von Granaticin ist die 2,6-Didesoxyhexose, die mit C-9 und C-10 verknüpft ist. Sie wird während der Biosynthese aus Glucose-1-phosphat gebildet.



**Abbildung 53:** Biosynthese der 2,6-Dideoxyglucose

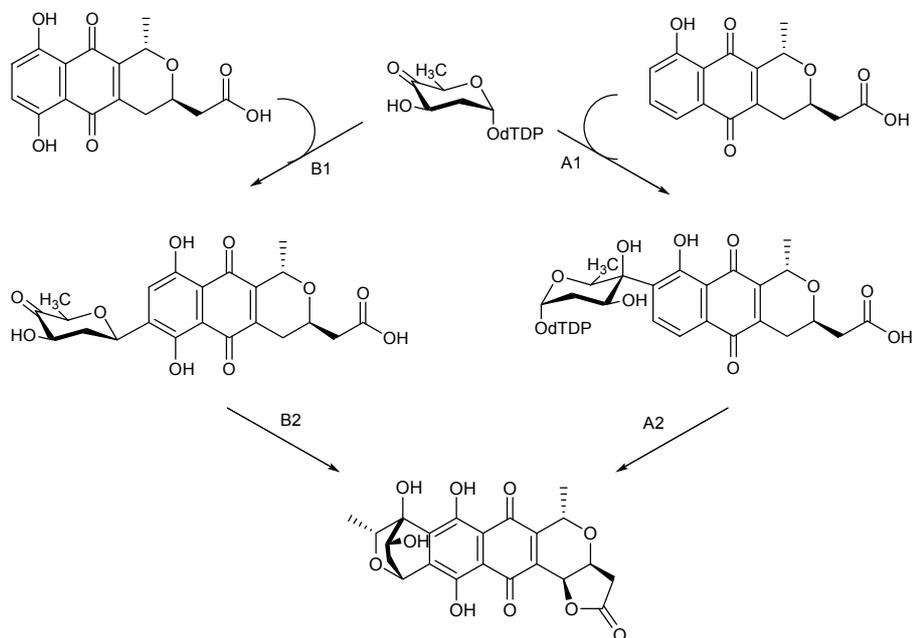
<sup>128</sup> a) M. A. Fernández – Moreno, E. Martinez, J. L. Caballero, K. Ichinose, D. A. Hopwood, F. Malpartida, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 24854 – 24863.

<sup>129</sup> K. Ichinose, D. J. Bedford, D. Tornus, A. Bechtold, M. J. Bibb, W. P. Reville, H. G. Floss, D. A. Hopwood, *Chemistry & Biology*, **1998**, 5, 647 – 659.

<sup>130</sup> T. Taguchi, Y. Ebizuka, D. A. Hopwood, K. Ichinose, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 11376 - 11380.

Hierbei wird das Glucose-1-phosphat in dTDP-Glucose überführt, anschließend an C-6 reduziert und in 4-keto-1-dTPD-glucose überführt. Im Anschluss wird die C-2 reduziert und über eine Isomerisierungsreaktion letztendlich 2,6-Dideoxy-4-keto-dTDP-glucose gebildet<sup>131</sup>. Für die Verknüpfung mit dem Aglycon werden zwei unterschiedliche Wege vorgeschlagen (Abbildung 54) die von der Anwesenheit der Hydroxygruppe an C-8 abhängig sind. Weg A setzt ein Fehlen des Sauerstoffatoms an C-8 voraus. Hier wird die Hexose über eine intermolekulare Aldolreaktion, bei der die 4-Ketogruppe von C-10 des Aglycons angegriffen wird, eingeführt. Im Anschluss folgen die Hydroxylierung an C-8, die intramolekulare Cyclisierung von C-9 und C-1' und die Bildung des Lactons. Weg B setzt das Vorhandensein der Hydroxygruppe an C-8 voraus, wobei hier die Einführung des Zuckers über einen Glycosyltransfer von O-8 nach C-9 eingeleitet wird. Anschließend folgt hier eine intramolekulare Aldolkondensation zwischen C-10 und C-4' und dann die Bildung des Lactons<sup>121</sup>.

Aufmerksamkeit haben diese Vorgänge nicht nur wegen der Biosynthese des ungewöhnlichen Desoxyzuckers erhalten, der von Interesse ist, da verschiedene Desoxyzucker sowohl auf den Zellwänden Gram-negativer Bakterien zu finden sind<sup>132</sup>, als auch in vielen Naturstoffen, wie unter anderem in den schon erwähnten: Aquayamycin **81**, Daunomycin **75** und Erythromycin **74**, vorkommen.



**Abbildung 54:** Zwei mögliche Wege der C-Glycosilierung des Aglycons von Granaticin

<sup>131</sup> a) G. Dräger, S.-H. Park, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 2611 – 2612; b) H.-W. Liu, J. S. Thorson, *Annu. Rev. Microbiol.*, **1994**, *48*, 223 – 256.

<sup>132</sup> A. Kirschning, A. F. W. Bechthold, J. Rohr, *Top. Curr. Chem.*, **1997**, *188*, 1 – 84.

#### 5.4 Synthetische Zugänge zu Granaticin

Aufgrund der guten Verfügbarkeit von Granaticin aus den Extrakten verschiedener Streptomyceten hat Granaticin nicht so große synthetische Anstrengungen hervorgebracht, wie das z. B. bei den Maytansinen der Fall war und ist. Dennoch hat sich die Gruppe um Eiichi Yoshii in den 80er Jahren mit der Synthese des Granaticins beschäftigt. Nach einer racemischen Totalsynthese im Jahr 1987<sup>133</sup> stellte diese Arbeitsgruppe 1989 dann eine enantioselektive Variante der Darstellung<sup>134</sup> vor.

Ausgehend von der enantiomerenreinen aromatischen Verbindung **88** wird in fünf Stufen die Verbindung **89** erhalten, die im fertigen Naturstoff die Ringe D und E bilden.

3,4-Di-O-acetyl-L-rhamninal **90** wird in vier Stufen in das Amid **91** überführt. Die anschließende Kupplung der Fragmente **89** und **91** führt zum Aufbau des vollständigen Kohlenstoffgerüsts in Verbindung **92**. Davon ausgehend wird zunächst das Chinon zum Hydrochinon reduziert, das Lacton gebildet und anschließend das Acetonid **93** entschützt. Abschließend wurde eine Methyletherspaltung durchgeführt und der Naturstoff **76** so in einer Gesamtausbeute von 5.6 % über 10 Stufen in der längsten linearen Sequenz erhalten.

---

<sup>133</sup> K. Nomura, K. Okazaki, K. Hori, E. Yoshii, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 3402 – 3408.

<sup>134</sup> K. Okazaki, K. Nomura, E. Yoshii, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1989**, 354 – 356.

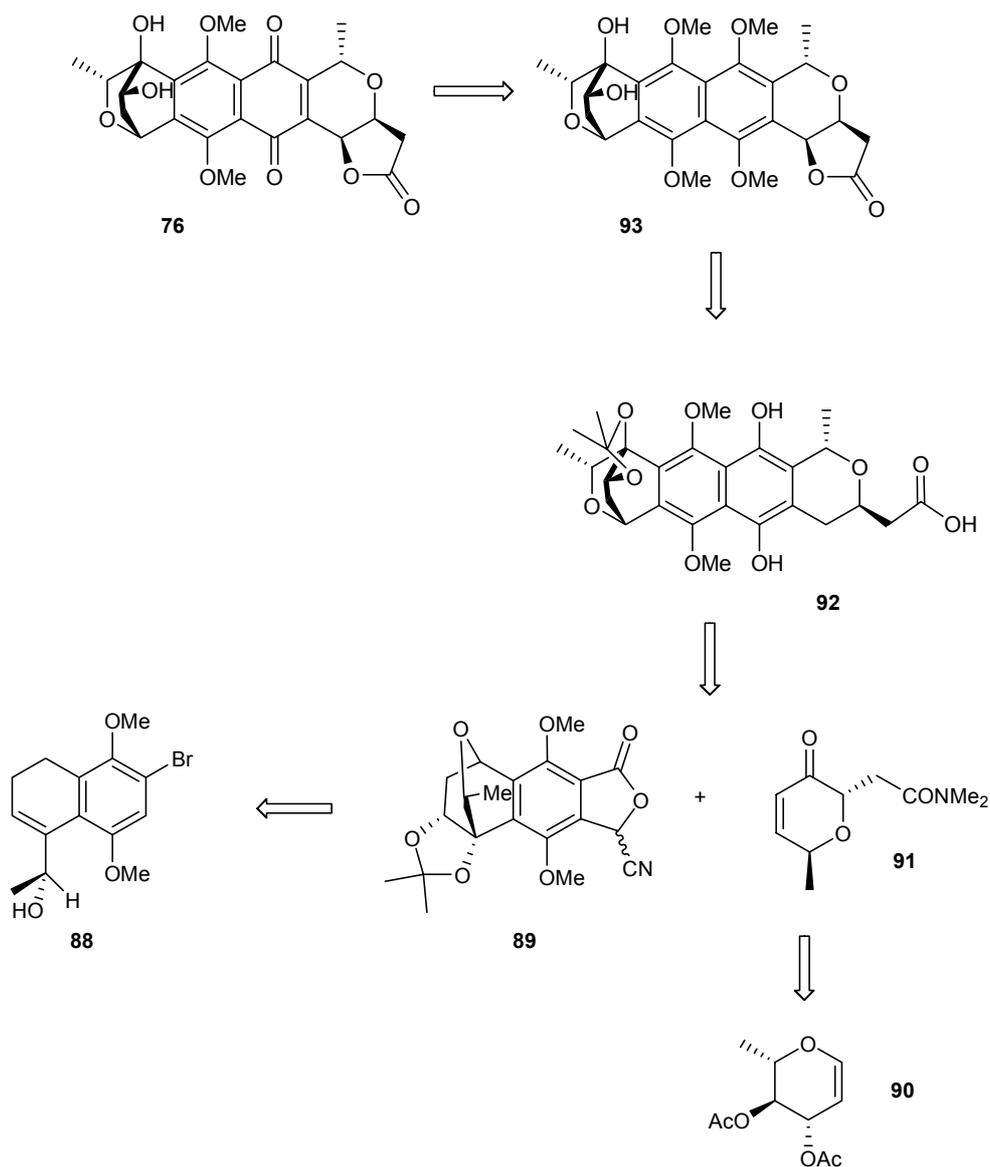


Abbildung 55: Retrosynthese von Granaticin bei der Synthese nach Yoshii et al

## 5.5 Biotransformationsstrategien

Die Erzeugung neuer Naturstoffderivate zur Verwendung als Antiinfektiva oder in der Krebstherapie ist eine tragende Säule in der organischen Synthese und Wirkstoffforschung<sup>135</sup>. Durch die Entwicklung immer neuer Resistenzen pathogener Keime

<sup>135</sup> H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeck, *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 619 – 627.

und den immer noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismen der Tumorentstehung und -bekämpfung besteht ein nicht endender Bedarf an neuen Wirkstoffen, die entweder aus natürlicher Quelle oder aus dem Labor kommen können. Eine viel versprechende Möglichkeit, an interessante Strukturen zu gelangen, ist die Kombination der Synthesebemühungen mit der im entsprechenden Organismus vorhandenen Biosynthese. Diese häufig als Mutasyntese<sup>136</sup> oder Vorläufer dirigierte Biosynthese bezeichnete Technik findet immer größeres Interesse<sup>137</sup>. Sie beruht auf der Aufnahme und dem Einbau von Biosynthesevorläufern durch entsprechende Organismen wie Bakterien oder Pilze. Diese Methode vereinigt auf elegante Weise die synthetische Arbeit des Chemikers mit dem Nutzen des komplexen schon vorhandenen Biosyntheseapparates des verwendeten Organismus. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Vorgehensweisen. So können zum einen zum Produktionsmedium in dem das Bakterium kultiviert wird artifizielle Biosynthesevorläufer zugesetzt werden, die dann mit den natürlichen im Medium vorhandenen Biosynthesevorläufern um den Einbau in den Sekundärmetaboliten konkurrieren (precursor-directed biosynthesis)<sup>138</sup>. Zum anderen können Vorläufer an Blockmutanten verfüttert werden, bei denen z. B. die Startsequenz der Polyketidsynthase inaktiviert ist. Durch strukturelle Ähnlichkeit mit dem natürlichen Vorläufer besteht die Möglichkeit ausgeschaltete Biosyntheseeinheit zu umgehen und ein dem Naturstoff ähnliches Produkt zu erhalten (mutational biosynthesis)<sup>139</sup> – wie in der Doktorarbeit von M. Brünjes in unserer Gruppe geschehen. Die precursor-directed biosynthesis soll zum Abschluss dieser Arbeit zur Verwendung kommen.

---

<sup>136</sup> K. L. Rinehart, *Pure Appl. Chem.*, **1977**, *49*, 1361 – 1384.

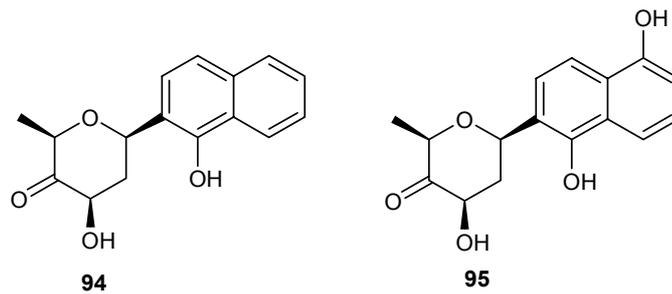
<sup>137</sup> M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 362 – 365.

<sup>138</sup> S. Grond, I. Papasavrou, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 1875 – 1881.

<sup>139</sup> S. Weist, R. D. Süßmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2005**, *68*, 141 – 150.

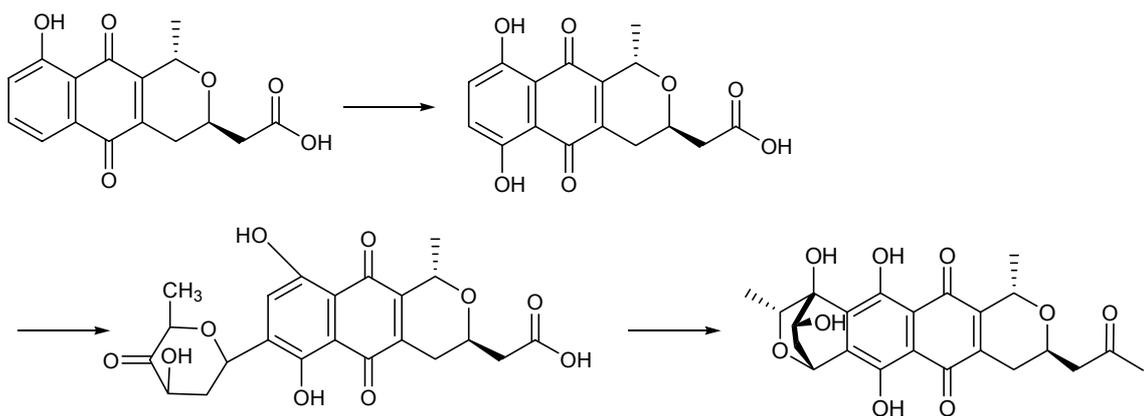
## 6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung unterschiedlicher aromatische C-Glycoside für die precursordirected biosynthesis. Diese C-Glycoside beinhalten Teile des im Naturstoff vorkommenden aromatischen Ringsystems, sollen aber unterschiedliche Oxidationsmuster aufweisen.



**Abbildung 56:** Biosynthesevorläufer für die Verfüterung

Nach Darstellung der Vorläufer für die Biosynthese werden diese an *Streptomyces violaceoruber* T22 verfüttert. Dabei soll überprüft werden, ob eine solche vorläuferdirigierte Biosynthese überhaupt mit diesem uns zur Verfügung stehenden Stamm möglich ist. Des Weiteren soll beobachtet werden, ob das Bakterium das Oxidationsmuster der verfütterten Substrate ändert.

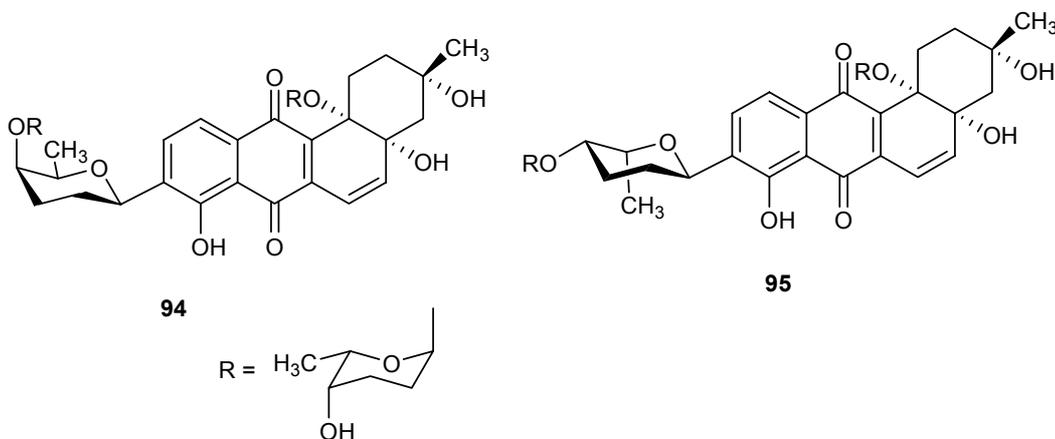


**Abbildung 57:** Vorschlag zur Verknüpfung des Zuckers mit dem Aglycon bei der Biosynthese von Granaticin, beim Nachweis des Ringschlusses während der Verfüterung

Eine weitere wichtige zu klärende Frage ist, ob der Ringschluss zwischen dem bereitgestellten Zucker und dem Aromaten stattfindet.

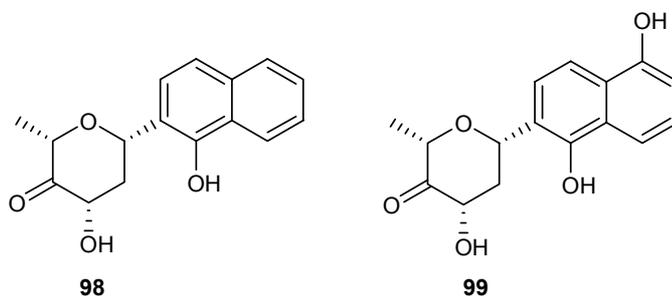
Kann man diesen nachweisen, handelt es sich um ein deutliches Indiz zum Verlauf der Verknüpfung des Zuckers mit dem Aglycon in der Biosynthese (Kapitel 5.3.1). Demnach würde zuerst der Aromat oxidiert werden. Der Zucker würde dann über eine Glycosyltransferase in den aromatischen Ring hineingereicht werden, um anschließend über eine Aldolase den Ringschluss zu vollziehen (Abbildung 57).

Hoffmeister et al.<sup>140</sup> berichteten über die Darstellung von Urdamycinderivaten mit beiden Enantiomeren der Rhodinose (Verbindung **96**, **97**) unter Verwendung derselben Mutante von *Streptomyces fradiae* RN-435 (Abbildung 58).



**Abbildung 58:** Urdamycin R (**96**) und Urdamycin S (**97**)

Dies legt die Frage nahe, ob auch eine Wildtype, das entsprechenden Enantiomer des im Naturstoff vorkommenden Zuckers als Biosynthesevorläufer anzunehmen. Durch die Synthese der entsprechenden C-Glycoside mit dem L-Zucker soll auch diese Möglichkeit der Anwendung durch Verfütterungsversuche überprüft werden.



**Abbildung 59:** Beispiele für Biosynthesevorläufer für die Verfütterung

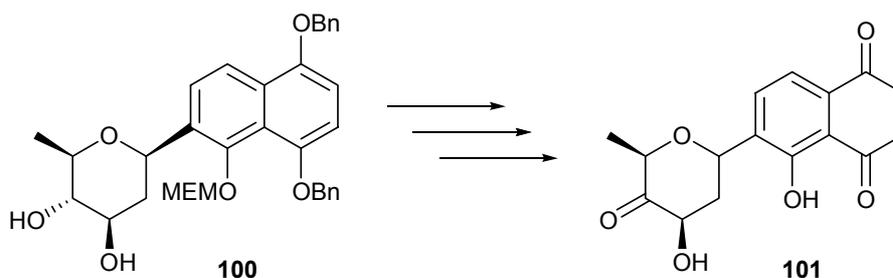
<sup>140</sup> D. Hoffmeister, G. Dräger, K. Ichinose, J. Rohr, A. Bechthold, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4678 – 4679.

## 7 Darstellung der Biosynthesevorläufer

Im Folgenden werden hier zunächst die synthetischen Studien zu den dargestellten Biosynthesevorläufern beschrieben. Die Experimente sind hierbei in einer Reihenfolge dargestellt, welche zwar nicht den chronologischen Ablauf der Synthesen wiedergibt, die sich aber zum Verständnis des Projektes als vorteilhaft erweisen wird.

So wird zuerst auf die Synthesen der Biosynthesevorläufer **95** und **99** und dann auf die Synthese der Verbindungen **94** und **98** eingegangen.

Im Anschluss wird ein Synthesekonzept zu einem Biosynthesevorläufer mit höher oxidiertem aromatischen System **101** beschrieben. Aber aufgrund der ineffizienten Glycosylierungsmethode, die zu Verbindung **100** führt, wurde dieses Konzept nicht zu Ende verfolgt.



**Abbildung 60:** Alternativ substituierte Verbindung als Biosynthesevorläufer

### 7.1 Synthese des Biosynthesevorläufers **95** mittels 3,4-Di-O-benzyl-D-rhamninal und 1,5-Dihydroxynaphthalin

Die Synthese soll ausgehend von Tri-O-acetyl-D-glucal **102** zum Glycosyldonor **104** führen. Dieser soll dann mit 1,4-Dihydroxynaphthalin als Aglycon gekuppelt werden. Anschließend werden die Benzylschutzgruppen entfernt und selektiv die Position 3' am Zucker silyliert um die Hydroxylgruppe an C-4' oxidieren zu können. Nach erfolgter Entschützung soll dann das Glycosid **95** erhalten werden.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei diesen Verbindungen um Enantiomere handelt, wird die Synthese zunächst nur für den D-Zucker vorangetrieben und optimiert. Ist eine

Route gefunden, die zum Ziel der Synthese (Verbindung **95**) führt, wird die Synthese zu Verbindung **99** sich in keinem Punkt davon unterscheiden, weshalb dann nur in aller Kürze, der Vollständigkeit halber, auf diese eingegangen wird.

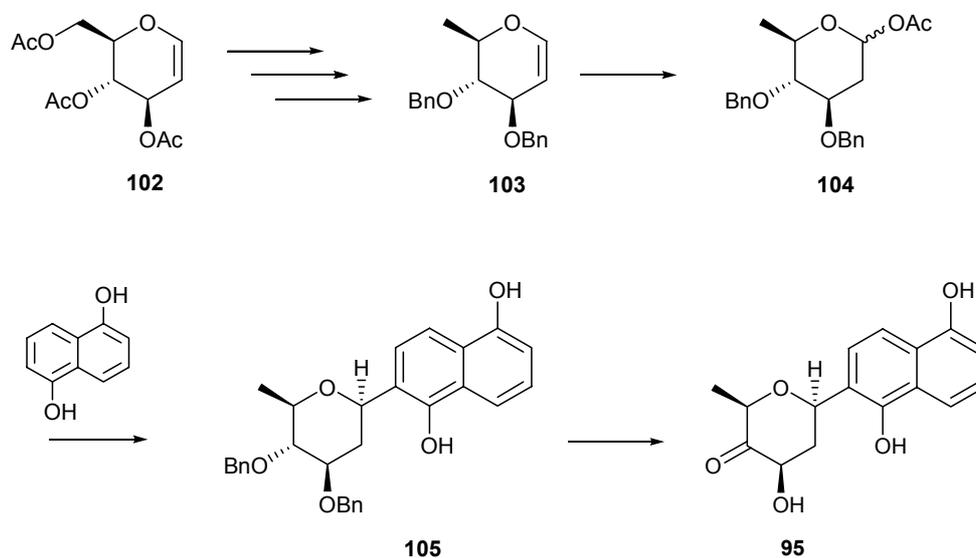


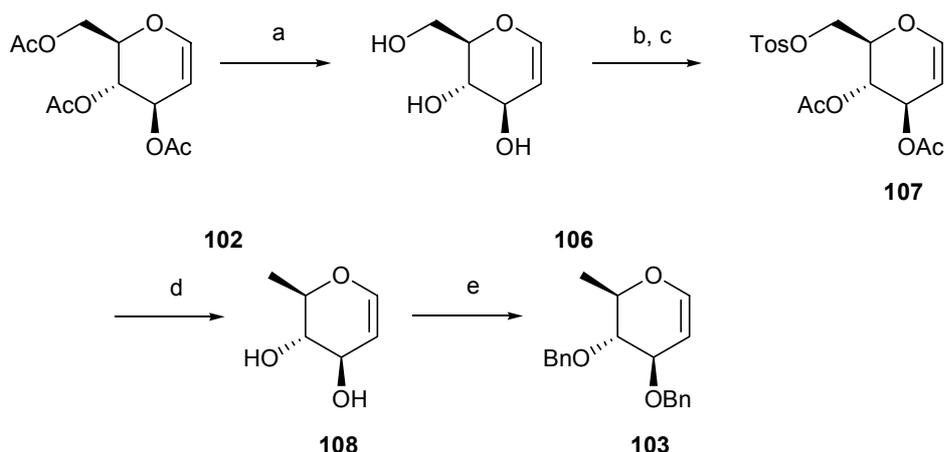
Abbildung 61: Synthesestrategie zum Vorläufer **95**

Zunächst wird auf die Synthese des verwendeten 3,4-Di-O-benzyl-D-rhamnals **103** eingegangen. Anschließend wird die Darstellung des entsprechenden C-Glycosids mit 1,5-Dihydroxynaphthalin **126** beschrieben. Die darauf folgenden Bemühungen zur Debenzylierung waren erfolglos. Die Strategie musste dann angepasst werden, worauf aber in Verlauf der Beschreibung der Ergebnisse noch eingegangen wird.

### 7.1.1 Synthese des 3,4-Di-O-benzyl-D-rhamnals

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen Tri-O-acetyl-D-glucal **102** wird wie in Schema 14 dargestellt mit Natriummethanolat das entschützte D-Glucal **106** erhalten. Dieses wird mit *para*-Toluolsulfonsäurechlorid an C-6 regioselektiv tosyliert<sup>141</sup>. Da die verbleibenden Hydroxygruppen bei der Aufarbeitung zum aus dem <sup>5</sup>H<sub>4</sub> konfigurierten

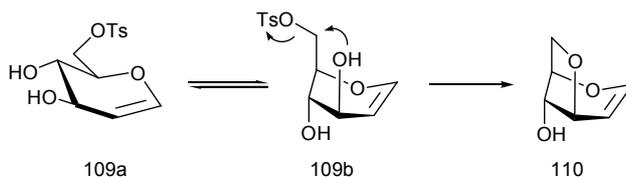
<sup>141</sup> J. S. Brimacombe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1971**, *10*, 236 – 248.



**Schema 14:** Reagenzien und Bedingungen: a) NaOMe, MeOH (99%); b)  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ , *p*-Tos-Cl,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  c)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{NEt}_3$  (83% über zwei Stufen); d)  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , (99%) e) Bn-Br, NaH, TBAI, THF, (53%).

Glucal **107b** zum Anhydrozucker **108** (Abbildung 62) weiterreagieren können<sup>142</sup>, wird die Veresterung mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  *in situ* durchgeführt.

Die so erzeugte Verbindung **107** wird nun mit  $\text{LiAlH}_4$  zu D-Rhamnal **108** reduziert und fällt in einer Ausbeute von 93 % an. Zur weiteren Verwendung wird das D-Rhamnal mit Benzylbromid zur gewünschten Verbindung **103** umgesetzt, wobei Ausbeuten um 60 % erreicht werden.



**Abbildung 62:** Nebenreaktion zum Anhydrozucker **110**

### 7.1.2 Darstellung des C-Glycosids **105**

<sup>142</sup> G. Dräger, *Dissertation*, Technische Universität Clausthal, **1997**.

## 7.1.2.1 Darstellung des Glycosyldonors 111

Acylglycoside haben sich für die Darstellung von aromatischen C-Glycosiden als gute Donoren bewährt. Seit den frühen 70er Jahren werden sie immer wieder für verschiedene Glycosylierungen verwendet.<sup>143</sup> So sollten sie auch hier zum Einsatz kommen. Erste Versuche der Darstellung des Acylglycosid mit HCl/AcOH blieben erfolglos. So wurde das von Falck *et al*<sup>144</sup> beschriebene Konzept zur Addition von PPh<sub>3</sub>HBr an Glucal verwendet. Hier wurde die katalytische Variante der Reaktionsführung gewählt, da die beim Einsatz eines Äquivalentes PPh<sub>3</sub>HBr entstehenden Phosphoniumsalze nicht weiter mit Akzeptoren zu Glycokonjugaten reagieren können<sup>145</sup>.

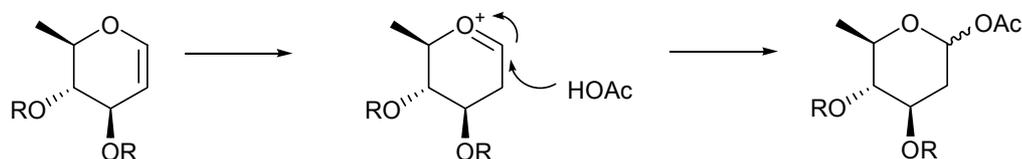
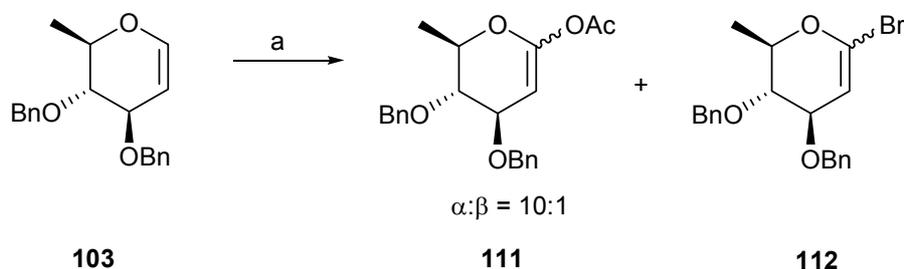


Abbildung 63: Bildung von Acylglycosiden

Unter Verwendung von 20 mol% PPh<sub>3</sub>HBr konnte hier das benzylierte D-Rhamnaldersivat **111** in guten Ausbeuten von 72 % dargestellt werden. Dabei hat es sich als vorteilhaft herausgestellt der Reaktionsmischung zu der verwendeten Essigsäure ein Äquivalent Acetanhydrid zuzugeben. Das dabei entstandene Anomerenverhältnis beträgt  $\alpha:\beta=10:1$ . Da beide Anomeren für die Darstellung der Aryl-C-glycoside mit demselben Ergebnis eingesetzt werden können, wurde hier auf eine tiefere Optimierung der Reaktion hinsichtlich des Anomerenverhältnisses verzichtet.



<sup>143</sup> a) H. Hosoyama, T. Atsumoto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1997**, 1211-1212.

<sup>144</sup> V. Bolitt, C. Mioskowski, S.-G. Lee, J.R. Falck, *J. Org. Chem.*, **1990**, *52*, 5812 – 5815.

<sup>145</sup> J. B. Ousset, C. Mioskowski, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 5903 – 5906.

Als Nebenprodukt fiel in einer Ausbeute von 5 % das bromierte Produkt **112** an, welches im weiteren Verlauf ebenfalls erfolgreich als Glycosyldonor eingesetzt werden konnte.

### 7.1.2.2 Mechanismus zur Darstellung von C-Arylglycosiden

Nachdem immer neue Naturstoffe mit antitumorale Wirkung entdeckt wurden, die C-Arylglycoside enthalten, erhielt diese Strukturklasse Ende der 80er Jahre wachsende Aufmerksamkeit. Bei der Totalsynthese von Granaticin von Nomura *et al.*<sup>128</sup> wurde die Zuckereinheit am Aromaten noch ausgehend von der mentholähnlichen Verbindung **88** aufgebaut. Es wurde keine Glycosylierung des Aromaten durchgeführt. Erst die von Matsumoto *et al.*<sup>146</sup> veröffentlichte Möglichkeit zur Bildung aromatischer C-Glycoside erweiterte diesbezüglich die synthetischen Möglichkeiten. So konnten die Glycosylierungen, ausgehend von einem Glycosyldonor wobei sowohl Acylglycoside, Methylglycoside oder die entsprechenden Fluoride<sup>147</sup> zum Einsatz kamen, durchgeführt werden. Die Addition an den Aromaten erfolgte mit Hilfe von Promotoren. Zunächst dienten dazu Lewisäuren wie  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  oder  $\text{SnCl}_4$ , später wurden zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeiten Verbindungen wie  $\text{Cp}_2\text{MCl}_2\text{-AgClO}_4$  (M= Ti, Zr, Hf) zugesetzt, wobei sich die Hafniumverbindungen als am besten geeignet herausgestellt haben<sup>148</sup>. Toshima *et al.*<sup>149</sup> stellten 1992 ein weiteres Promotorsystem vor. Dabei wurde eine Kombination aus TMSOTf und  $\text{AgClO}_4$ , die im Verhältnis 1:1 eingesetzt wurden, verwendet. Mit diesen Methoden war es möglich C-Arylglycoside mit spezifischer Stereochemie darzustellen und für die Synthese von Naturstoffen zugänglich zu machen<sup>150</sup>. Die Übertragung dieser Methode auf Aminozucker wurde erst 2004 realisiert<sup>151</sup>. Wieder war es die Arbeitsgruppe von K. Suzuki, die eine Lösung dieses Problems vorstellte. Durch die Verwendung von  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  als Lewisäure in Verbindung mit Molekularsieb ließen sich sowohl neutrale, als auch Aminozucker zur Glycosylierung von Aromaten verwenden. Der von Suzuki vorgeschlagene Mechanismus, wird heute gemeinhin anerkannt. Es wird von einem dreistufigen Mechanismus ausgegangen (Abbildung 64), der am Beispiel der hier verwendeten D-Olivoose dargestellt wird. Dabei

<sup>146</sup> T. Matsumoto, M. Katsuki, K. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 6935 – 6938.

<sup>147</sup> T. Matsumoto, M. Katsuki, H. Jona, K. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 6185 – 6188.

<sup>148</sup> T. Matsumoto, T. Hosoya, K. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 4629 – 4632.

<sup>149</sup> K. Toshima, G. Matsuo, K. Tatsuta, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 2175 – 2178.

<sup>150</sup> a) D. Y. W. Lee, M. He, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2005**, 14, 1333 – 1350; b) M. A. Brimble, T.J. Brenstrum, *Arcivok*, **2001**, 7, 37 – 48.

<sup>151</sup> A. Ben, T. Yamauchi, T. Matsumoto, K. Suzuki, *Synlett*, **2004**, 2, 225 – 230.

findet zuerst eine O-Glycosylierung zur Verbindung **A** statt. Über die Bildung des Oxonium-phenolat-Ionenpaares **B**, bei der die Lewissäure die entscheidende Rolle spielt, wird die Umlagerung vom O- zum C-Glycosid durchgeführt. Die nun vorliegende Verbindung **C** kann in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen (**C<sub>a</sub>** und **C<sub>b</sub>**) in der der Aromat entweder axial ( ${}^4C_1$ ) oder äquatorial ( ${}^1C_4$ ) steht. Es wird die Konformation bevorzugt, bei der die C-(1)-Arylgruppe in äquatorialer Position ist (**C<sub>b</sub>**), hierbei ist der anomere Effekt vernachlässigbar und es werden drei axial stehende Substituenten in Kauf genommen. Aus der  ${}^1C_4$  - Konformation heraus, kann das Chinonmethid **D** als Übergangstufe gebildet werden, welches dann zum thermodynamisch stabileren  $\beta$ -Anomer **E** weiterreagiert. Die Triebkraft hierfür ist die im  $\beta$ -Glycosid vorhandene günstigste Konformation ( ${}^4C_1$ ) in der alle Substituenten am Zucker äquatorial stehen<sup>152</sup>. Wie im weiteren Verlauf der Arbeit zu sehen sein wird, ist es möglich anhand der Reaktionsführung sowohl das  $\alpha$ - als auch das  $\beta$ -Anomer zu isolieren.

---

<sup>152</sup> T. Hosoya, Y. Ohashi, T. Matsumoto, K. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 663 – 666.

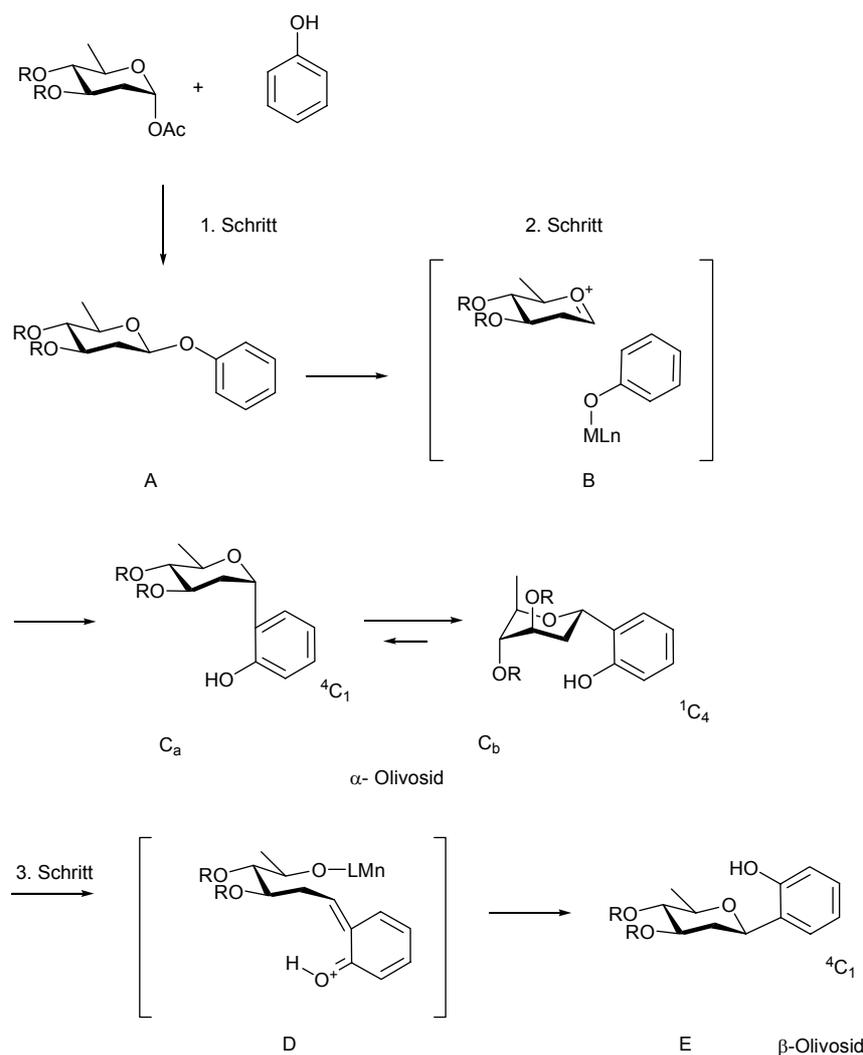


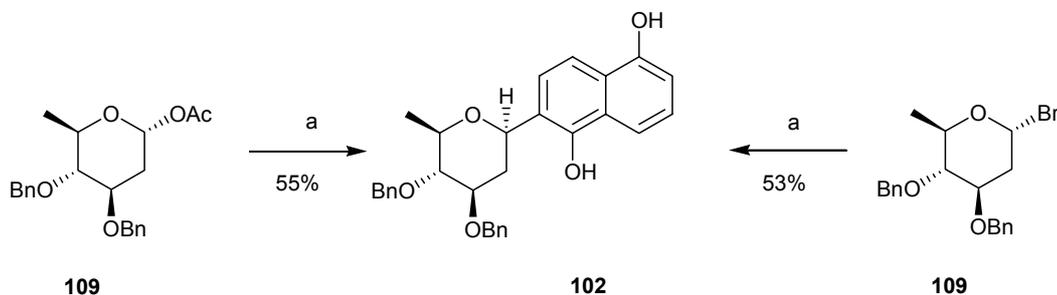
Abbildung 64: Mechanismus der Bildung von β-C-Arylglycosiden

### 7.1.2.3 Glycosylierung von 1,5-Dihydroxynaphthalin

Die Glycosylierung wurde unter Berücksichtigung des zuvor beschriebenen Mechanismus mit  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  in Acetonitril<sup>153</sup> durchgeführt. Hierbei konnten sowohl das Acylglycosid **111** als auch das in der Nebenreaktion entstandene Bromid **112** erfolgreich in das C-Arylglycosid überführt werden. Die Zugabe des  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  fand unter Eiskühlung statt, die Reaktionszeit betrug 60 min. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die Lewisäure vor der Zugabe zur Reaktion mit dem verwendeten Lösungsmittel zu verdünnen und tropfenweise zur Reaktionsmischung zuzugeben. Dadurch wurde eine milde Reaktionsführung erreicht.

<sup>153</sup> K. Krohn, A. Agocs, C. Bäuerlein, *J. Carbohydr. Res.*, **2003**; 22, 579 – 592.

Die Ausbeuten steigen durch diese Maßnahme von 34% auf 55%. Die säulenchromatographische Aufreinigung des Produktes erwies sich als äußerst schwierig.



**Schema 16:** Reagenzien und Bedingungen: a) 1,5-Dihydroxynaphthalin,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  1,2 Äq,  $\text{CH}_3\text{CN}$

Obwohl nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchungen eine gute Trennungen per Säulenchromatographie zu erwarten war, konnte das Produkt zunächst nicht oder nur teilweise vom 1,5-Dihydroxynaphthalin, welches im Überschuss eingesetzt wurde, getrennt werden. Hierzu wurden verschiedene standardisierte Laufmittelgemische (Petrolether/Essigester und Dichlormethan/Methanol) in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt. Da diese Methode nicht den gewünschten Erfolg brachte wurde auf Toluol-Basierte Laufmittelgemische (Toluol/Dichlormethan und Toluol/Methanol) zurückgegriffen. Hierbei wurde gehofft, dass das aromatische Laufmittel die Trennung der aromatischen Systeme voneinander begünstigt. Der erhoffte Erfolg blieb aus. Die Mischungen mit Methanol brachten eine in Teilen bessere Trennung, aber die Substanzen wurden zu schnell von der Säule eluiert. Um unpolare Laufmittelmischungen zu testen, wurde auf Cyclohexan/Essigester zurückgegriffen, was wiederum keine befriedigende Trennung der Substanzen brachte. So wurde dieser Mischung etwas Methanol zugesetzt und nach Optimierung mit einer Laufmittelmischung von Cyclohexan/Essigester/Methanol (20:0.5:0.5) das gewünschte Ergebnis erzielt.

## 7.2 Strategie zur Synthese von 95 ausgehend von 105

Um zum gewünschten verfütterbaren Biosynthesevorläufer **95** zu gelangen, müssen am C-Glycosid diverse Manipulationen vorgenommen werden. So müssen zunächst die Benzylschutzgruppen entfernt werden und die erhaltene Verbindung **113** selektiv an Position 3' silyliert werden. Diese Silylierung sollte aufgrund der Tatsache, dass die sterisch weniger gehinderte Position 3' die reaktivere ist, zuerst an dieser Position erfolgen<sup>154</sup>. Die raumfüllende Schutzgruppe würde dann die Nachbarposition 4' so abschirmen, dass ein Angriff auf diese sterisch stark gehindert wäre. Eventuell auftretende Silylierungen der phenolischen Hydroxygruppen, würden billiger in Kauf genommen, da Silylphenolether nicht sehr stabil sind und eine Entschützung spätestens auf der letzten Stufe erfolgreich verlaufen sollte. Anschließend muss eine Oxidation zum 4-Ketozucker **115** durchgeführt werden. Hierbei ist die Oxidationsmethode nicht festgelegt. Favorisiert werden Oxidationen nach Swern oder mittels Dess-Martin-Periodinan, die schon in vielen Synthesen von Zuckerderivaten, Anwendung gefunden haben.<sup>155</sup> Für die finale Entschützung der Verbindung **115** zum Produkt **95** stehen diverse Methoden zur Verfügung.

---

<sup>154</sup> T. Matsumoto, T. Shoma, H. Yamaguchi, S. Kurata, K. Suzuki, *Synlett*, **1995**, 263 – 266.

<sup>155</sup> a) A. J. Wood, D. J. Holt, M.-C. Dominguez, P. R. Jenkins, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 8522 - 8529; b) K. C. Nicolaou, K. C. Fylakatakidou, H. Monenschein, Y. Li, B. Weyershausen, H. J. Mitchell, H.-x. Wei, P. Guntupalli, D. Hepworth, K. Sugita, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 15433 – 15442; V. Samano, M. J. Robins, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 5186 – 5188.

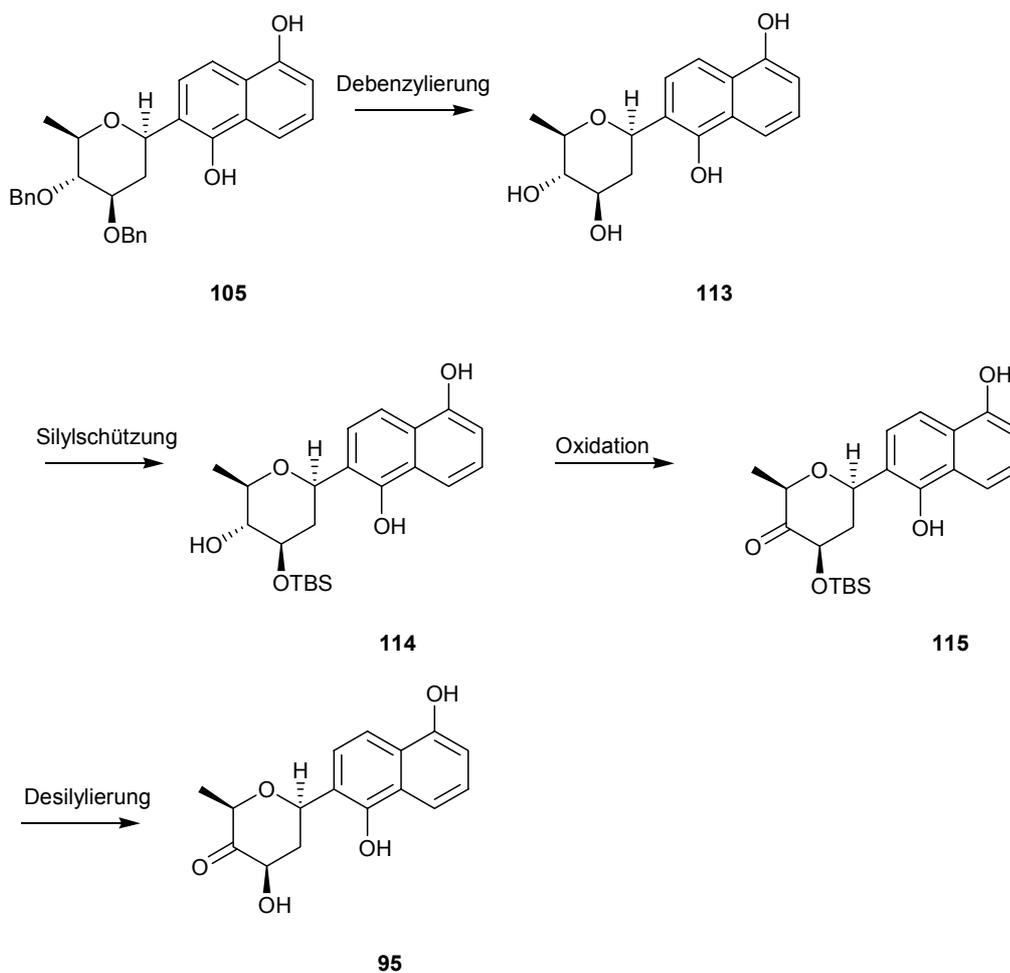


Abbildung 65: Synthesepfad für Verbindung 95 ausgehend von 105.

### 7.2.1 Debenzylierung von 105

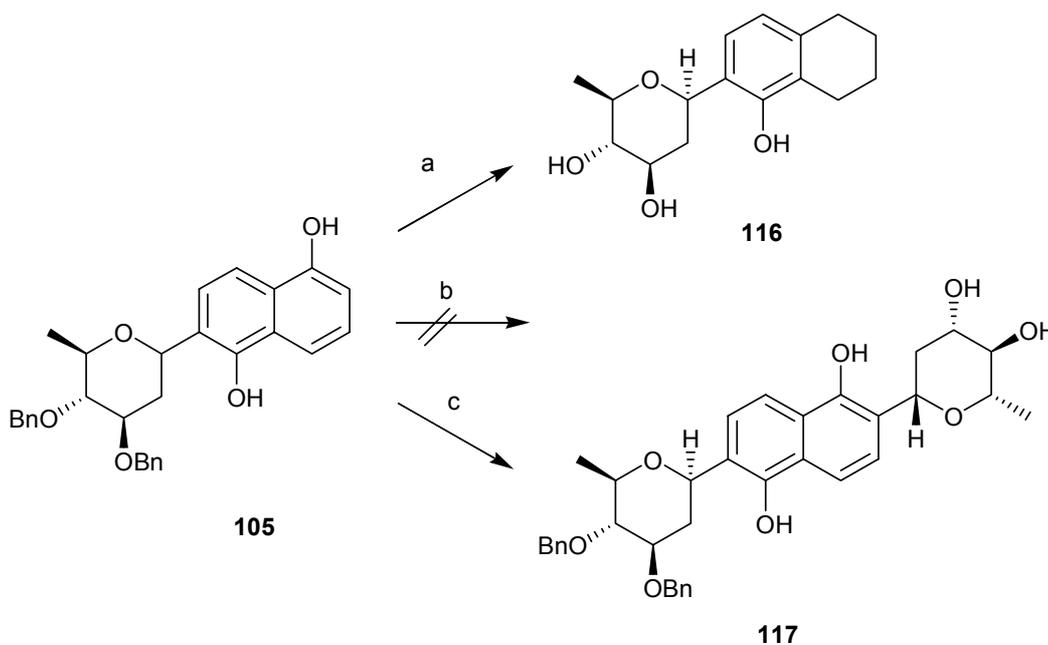
Zunächst wurde die Debenzylierung der Verbindung **105** durch Hydrierung mit  $H_2$  in Anwesenheit von 10% Palladium auf Aktivkohle in Methanol versucht; aber weder die Variation der Reaktionszeit, noch die der zugesetzten Menge des Katalysators führten zum erwünschten Erfolg.

Der Wechsel des Lösungsmittels zu THF lieferte zwar den entschützten Zucker, aber zusätzlich auch die teilweise Reduktion des aromatischen Ringes zu C-Glycosid **116**. Anschließend wurden Versuche zur Entschützung mit  $BBr_3$  unternommen, die entweder zu einer vollständigen Zersetzung des Edukts oder zu der symmetrischen Verbindung **117** führten. Sämtliche Versuche zur Entschützung sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Rkt	Katalysator	Lösungsmittel	Reaktionszeit	Ergebnis
1	Pd/C, 20 gew. %	MeOH	4 – 60 Std.	kein Umsatz
2	Pd/C, 50 gew. %	MeOH	4 – 60 Std.	kein Umsatz
3	Pd/C, 100 gew. %	MeOH	4 – 60 Std.	kein Umsatz
4	Pd/C, 50 gew. %	THF	60 Std.	Verbindung <b>116</b>
5	BBr <sub>3</sub> 10 Äq	CH <sub>3</sub> CN	5, 10, 15, 30 Min	Zersetzung
6	BBr <sub>3</sub> 8 Äq	CH <sub>3</sub> CN	5 Min	Zersetzung
7	BBr <sub>3</sub> 4 Äq	CH <sub>3</sub> CN	5 Min	Zersetzung
8	BBr <sub>3</sub> 2 Äq	CH <sub>3</sub> CN	5 Min	kein Umsatz
9	BBr <sub>3</sub> 2 Äq	CH <sub>3</sub> CN	100 Min	Verbindung <b>117</b>

**Tabelle 9:** Versuche zur Debenzylierung von **105**

Da diese Versuche nicht zum gewünschten Ergebnis führten, wurde die Schutzgruppenwahl überdacht und ausgehend von Verbindung **108** sollte nun mit Acetylschutzgruppen an den Positionen C-3 und C-4 des Zuckers weitergearbeitet werden. Die prinzipielle Strategie selbst wurde nicht verändert.

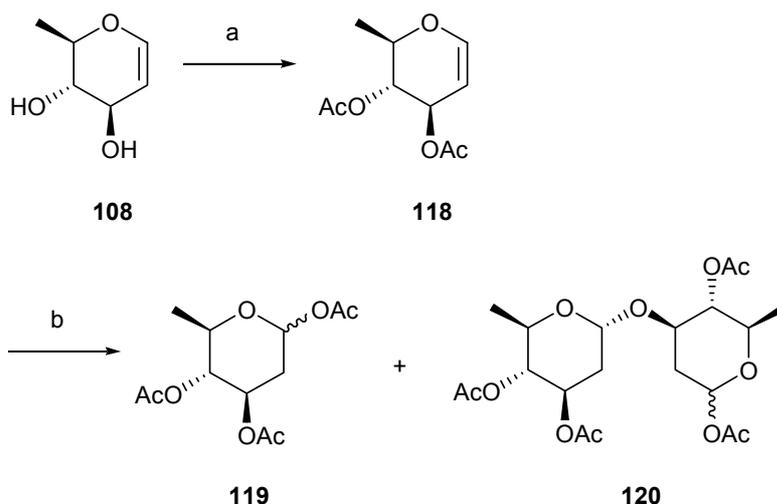


**Schema 17:** Reagenzien und Bedingungen: a) Pd/C, H<sub>2</sub>, THF; (63%) b) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH; c) BBr<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, (37%).

### 7.3 Darstellung von 92 mittels 3,4-Di-O-acetyl-D-rhamnal und 1,5-Dihydroxynaphthalin

#### 7.3.1 Darstellung des Glycosyldonors

Um die geänderte Strategie zu verfolgen, musste das D-Rhamnal in 3,4-Di-O-acetyl-D-rhamnal überführt werden. Hierzu wurde die Acetylierung mit  $\text{Ac}_2\text{O}$  in  $\text{NEt}_3$  über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Da das Produkt durch sein geringes Molekulargewicht im Ölpumpenvakuum Flüchtigkeit zeigte, wurden bei der zur Aufreinigung durchgeführten Säulenchromatographie leicht flüchtige Lösungsmittel eingesetzt und die Endtrocknung im Argonstrom durchgeführt. Die Ausbeuten waren mit 87% sehr gut.



**Schema 18:** Reagenzien und Bedingungen: a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{NEt}_3$ , (87%);  
b)  $\text{PPh}_3\text{HBr}$  0.25 Äq,  $\text{AcOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , (84%).

Die anschließende Überführung in das Acylglycosid **119** bedurfte einiger Optimierungsarbeit, nachdem erste Versuche mit katalytischen Mengen  $\text{PPh}_3\text{HBr}$  nur zu einer Ausbeute von 22% führten. Zudem war ein weiteres Produkt bei dieser Reaktion entstanden. Durch Massenspektrometrie und NMR-Messungen wurde es als das Disaccharid **120** identifiziert, welches in einer Ausbeute von 10% anfiel. Diese Reaktion sollte unterbunden werden, da sie naturgemäß das Edukt doppelt verbrauchte. So wurden diverse in Tabelle 10 aufgeführten Variationen erprobt. Es stellte sich heraus, dass die

optimale Menge des Katalysators, wie in den Versuchen zur Darstellung des benzylierten Glycosyldonors (Kapitel 7.1.2.1) bei 25 mol% liegt. Die Ausbeute ging bei Verwendung von mehr PPh<sub>3</sub>HBr drastisch zurück. Die häufig genutzte Methode zur Darstellung von Acylglycosiden mit AcOH/HBr 33%<sup>156</sup> lieferte kein zufrieden stellendes Ergebnis. Auch hier war das Anomerenverhältnis  $\alpha:\beta$  der acylierten Produkte unerheblich, da beide Isomere in der folgenden Glycosylierung eingesetzt werden konnten.

Rkt	Katalysator	Ausbeute 119	Anomerenverhältnis 119	Ausbeute 120
1	PPh <sub>3</sub> HBr 5mol%	22 %	$\alpha:\beta = 3:1$	10 %
2	AcOH/HBr	11 %	$\alpha:\beta = 1.2:1$	4 %
3	PPh <sub>3</sub> HBr 10mol%	57 %	$\alpha:\beta = 8:1$	9 %
4	PPh <sub>3</sub> HBr 20mol%	77 %	$\alpha:\beta = 10:1$	7 %
5	PPh <sub>3</sub> HBr 50mol%	37 %	$\alpha:\beta = 4:1$	8 %
6	PPh <sub>3</sub> HBr 25mol%	84 %	$\alpha:\beta = 12:1$	3 %

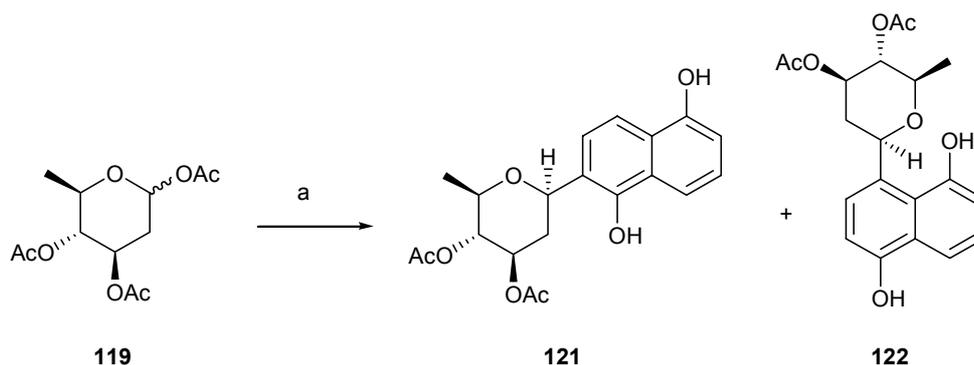
**Tabelle 10:** Optimierung der Reaktion zur Bildung von **119**

Die bei der Darstellung des analogen Benzylderivates **109** beobachtete Bildung des Bromids konnte hier nicht beobachtet werden.

### 7.3.2 Darstellung und Entschützung des C-Arylglycosids **121**

Zur Glycosylierung des 1,5-Dihydroxynaphthalins mit dem Glycosyldonor **119**, wurde in gleicher Weise vorgegangen wie schon bei der erfolgreichen Darstellung der Verbindung **105** geschehen. Unter Eiskühlung wurde die Kupplung mit 1.5 Äq BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O in Acetonitril durchgeführt. Das vermeintliche Produkt entstand hierbei in 74% Ausbeute.

<sup>156</sup> K. Bock, I. Lund, C. Pedersen, *Carbohydr. Res.*, **1981**, *90*, 7 – 16.



**Schema 19:** Reagenzien und Bedingungen: a) 1,5-Dihydroxynaphthalin,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$

Die säulenchromatographische Abtrennung des Produktes vom 1,5-Dihydroxynaphthalin ließ sich hier deutlich einfacher bewerkstelligen, als bei der Darstellung des benzylgeschützten Glycosids **102**. Bei der NMR-spektroskopischen Charakterisierung stellte sich heraus, dass zwei neue Verbindungen entstanden waren. Da das Massenspektrum nur eine Substanz anzeigte und die NMR-Spektren zwei verschiedene  $\beta$ -C-Arylglycoside offenbarte, konnte es sich nur um Regioisomere handeln, was im Gegensatz zu der von Suzuki für diese Reaktionsführung ausgeschlossenen Bildung des  $\beta$ -*para*-C-Arylglycosides<sup>157</sup> steht. Nach säulenchromatographischer Trennung der beiden Isomere konnten diese mittels 2D-NMR-Spektroskopie über die Fernkopplung des Wasserstoffatoms am anomeren Zentrum mit den entsprechenden Kohlenstoffatomen im aromatischen Ringsystem bestimmt werden. Das gewünschte  $\beta$ -*ortho*-C-Arylglycosid **121** ist in einer Ausbeute von 57 % entstanden, während das entsprechende *para*-Produkt **1** in 17 % Ausbeute vorlag. Um die Bildung des *para*-Produktes zu unterbinden, wurden diverse Versuche zur Optimierung der Reaktion durchgeführt, bei denen die Mengen des zugesetzten  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , die Reaktionszeit, die Reaktionstemperatur variiert wurden (Tabelle 11).

<sup>157</sup> K. Suzuki, *Pure Appl. Chem.*, **1994**, 66, 2175 – 2178

Rkt	Menge BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O [Äq]	Temperatur	Reaktionszeit	Produkte
1	1.5	0 → RT	90 Min	<b>121:122 = 3:1</b>
2	1.5	0 → RT	105 Min	<b>121:122 = 3:1</b>
3	1.5	-20°C → RT	90 Min	<b>121:122 = 3:1</b>
4	2.1	-20°C → RT	70 Min	<b>121:122 = 2.5:1</b>
5	1.5	0°C	60 Min	<b>121:122 = 5:1</b>

**Tabelle 11:** Versuche zu Optimierung der Bildung des Glycosids **121**

Da die Bildung des *para*-Produktes nicht unterdrückt werden konnte, wurde mit der in Tabelle 11 zuletzt aufgeführten Reaktionsführung weitergearbeitet und das *para*-Produkt säulenchromatographisch abgetrennt.

Das bei der vorangegangenen Strategie aufgetretene Schlüsselproblem der Entschützung des Zuckers am Aromaten, sollte sich auch hier nicht auf Antrieb lösen lassen. Zunächst wurden die Standardstrategien zur basischen Abspaltung von Acetylschutzgruppen durchgeführt (Tabelle 12).

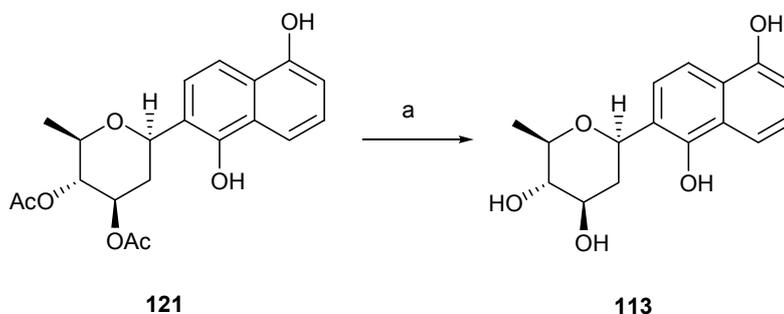
Rkt	Base	Ergebnis
1	NaOMe	Zersetzung
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Zersetzung
3	LiOH	Zersetzung
4	NEt <sub>3</sub>	Zersetzung

**Tabelle 12:** Versuche zur Entschützung von **121**

Nachdem diese Bemühungen erfolglos waren, da sich der Aromat unter basischen Bedingungen als instabil erwiesen hat, musste auf andere Methoden ausgewichen werden. So wurde die von Mori *et al.*<sup>158</sup> vorgestellte Umesterung mit KCN in Ethanol, als sehr milde Möglichkeit der Esterspaltung, ausprobiert. Diese Methode stellte sich als so mild heraus, dass keine Reaktion stattfand und das Edukt nach 10 Std. Reaktionszeit unter Rückfluss quantitativ reisoliert werden konnte. Als letzte Variante blieb die saure

<sup>158</sup> K. Mori, M. Tmoinaga, T. Takigawa, M. Matsui, *Synthesis*, **1973**, 790 – 791.

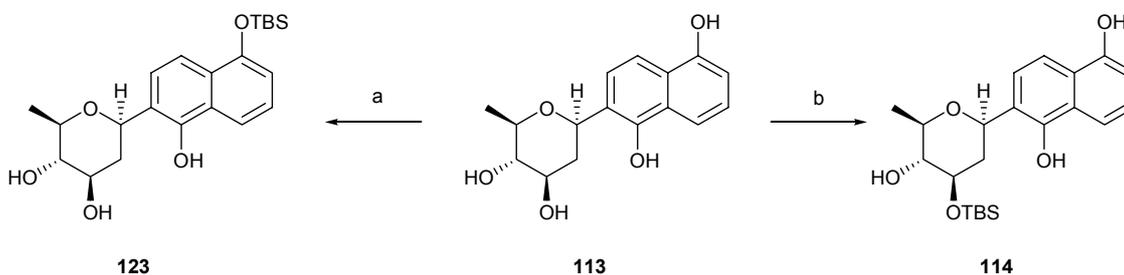
Esterspaltung mit *p*-Toluolsulfonsäure, welche nach 60 Std. bei 38°C in Dichlormethan/Methanol zum einschützten Produkt **113** in einer Ausbeute von 79% führte. Dabei wurde sowohl das Edukt als auch mono-entschützte Produkte isoliert, welche wieder eingesetzt werden konnten.



**Schema 20:** Reagenzien und Bedingungen: a) *p*-TsOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9:1), 38°C, 60 Std., (79%).

### 7.3.3 Selektive Silylierung zum Glycosid **114** und Oxidation zu **115**

Das vollständig entschützte Glycosid **113** sollte an C-3' selektiv silyliert werden. Hierzu wurde zunächst die Silylierung mit TBS-Cl in THF durchgeführt, die ausschließlich zum Produkt **123** führte. Auch ein Wechsel des Lösungsmittels führte hier nicht zu dem gewünschten Produkt. Die Verwendung von TBS-OTf in DMF mit 2,6-Lutidin als Base führte innerhalb von einer Stunde Reaktionszeit zum gewünschten Ergebnis in einer Ausbeute von 91% (Schema 21).



**Schema 21:** Reagenzien und Bedingungen: a) TBS-Cl, DMAP, THF, 0°C→RT; b) TBS-OTf, 2,6-Lutidin, DMF, 0°C→RT, (91%).

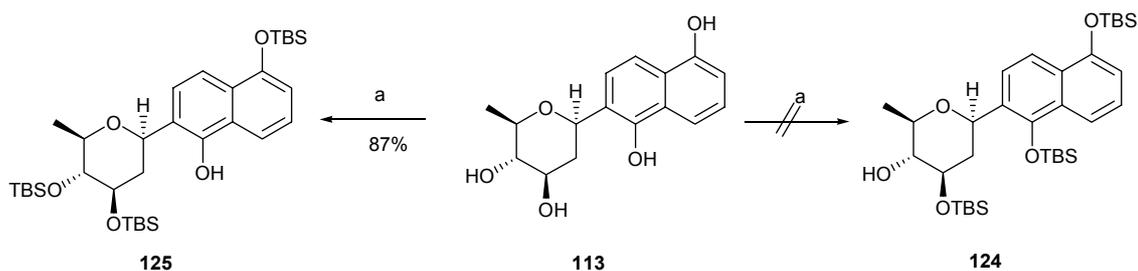
Das so erhaltene Produkt sollte mit einer milden Reaktionsmethode selektiv an C-4', oxidiert werden. Zunächst wurden Oxidationen nach Swern und mit Dess-Martin-Periodinan erprobt. Sämtliche Versuche, den Zucker zu oxidieren, schlugen jedoch fehl. Nach der Swern-Oxidation konnten weder Produkt noch Edukt isoliert werden. Die Oxidationen mit Dess-Martin-Periodinan führten nur zu Oxidationen am Aromaten. Diese waren grundsätzlich nicht unerwünscht, da im Laufe der Synthesen noch Biosynthesevorläufer mit unterschiedlichen Oxidationsmustern am Aromaten dargestellt werden sollten. Trotzdem zeigte sich keine Reaktion an C-4'. Weitere Methoden wie die Oxidation mit PCC, TPAP·NMO und die in unseren Arbeitskreis entwickelte Oxidation mit NaOCl, und Festphasen-gebundenem TEMPO<sup>159</sup> zeigten auch nicht das gewünschte Ergebnis. Die Bemühungen zur Oxidation von **114** zu **115** sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Rkt	Oxidationsmittel	Ergebnis
1	C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , DMSO	-
2	Dess-Martin-Periodinan	Oxidation am Aromaten
3	TPAP·NMO	Zersetzung
4	PCC	Zersetzung
5	PCC auf Silica	Zersetzung
6	NaOCl, TEMPO	Zersetzung

**Tabelle 13:** Versuche zur Oxidation von C-4'

Nachdem die direkten Versuche zu Oxidation fruchtlos blieben, wurde der Versuch unternommen, bei der Silylierung von **113** mit 3 Äq TBS-OTf auch die beiden phenolischen Hydroxygruppen als TBS-Ether zu schützen, die Oxidation des Aromaten zu verhindern und somit die Oxidation am C-4' zu ermöglichen. Nach der Silylierung von C-3' schien die in Nachbarschaft zum Zucker stehende Hydroxygruppe am Aromaten sterisch deutlich stärker gehindert zu sein, als die freie Hydroxygruppe am Zucker. Bei einem 5-fachen Überschuss von TBS-OTf wurden nicht, wie erwartet, beide phenolischen Hydroxygruppen unter Bildung von **124** silyliert, stattdessen wurde nur Verbindung **125** isoliert (Schema 22).

<sup>159</sup> K. Kloth, M. Brünjes, E. Kunst, T. Jöge, F. Gallier, A. Adebekian, A. Kirschning, *Adv. Synth. Catal.*, **2005**, *347*, 1423 – 1434.



**Schema 22:** Reagenzien und Bedingungen: a) TBS-OTf 3-5 Äq, 2,6-Lutidin, DMF, 0°C→RT

Nachdem sämtliche Versuche zur Oxidation bzw. nachträglichen Schützung und Oxidation von **112** gescheitert waren und offensichtlich der freie Aromat das Problem darstellte, wurde die Synthese neu überdacht und mit einem geschützten Aromaten neu begonnen.

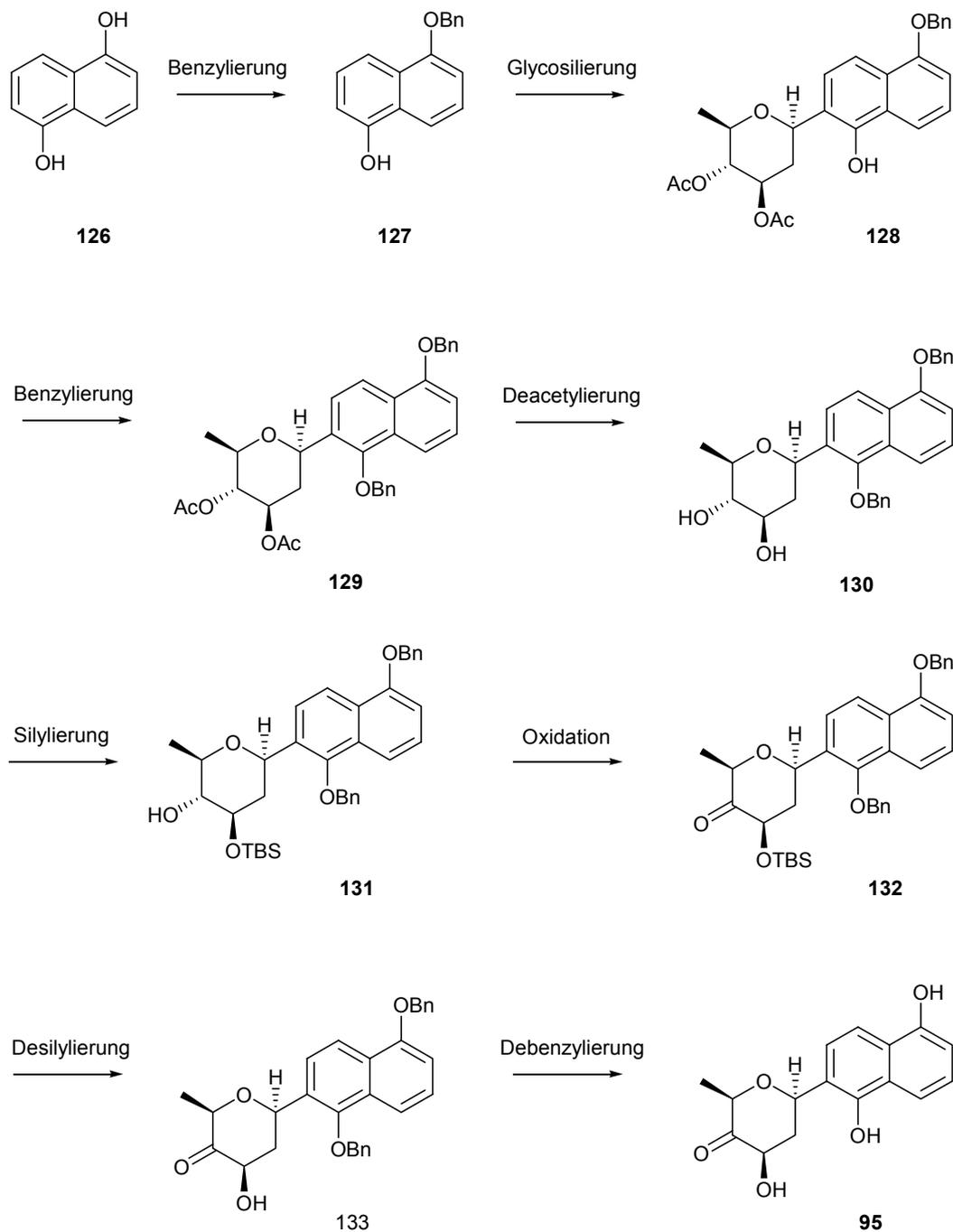
## 7.4 Darstellung von **95** über 3,4-Di-O-acetyl-D-rhamnal und 5-(Benzyloxy)-naphthalin-1-ol

### 7.4.1 Zusammenfassung der geänderten Strategie

Da hier der Syntheseweg noch einmal umgestellt wurde, wird die überarbeitete Strategie kurz vorgestellt (Abbildung 49). Es sei vorweg genommen, dass diese Strategie tatsächlich zum gewünschten Ziel nämlich, Verbindung **95**, führte.

Zunächst sollte eine Monobenzylierung des 1,5-Dihydroxynaphthalins erfolgen. Die anschließende Bildung des C-Arylglycosids sollte dann in der Hoffnung gelingen, durch den größeren sterischen Anspruch der Benzylschutzgruppe, die Bildung des *para*-C-Arylglycosids zu unterbinden. Die anschließende zweite Benzylierung des Aromaten sollte unter möglichst milden Bedingungen erfolgen, da eine Basensensitivität des Glycosids schon in der vorhergegangenen Synthesestrategie beobachtet wurde. Da der Aromat dann vollständig geschützt vorliegen würde, sollte auch eine basische Deacetylierung ohne Probleme durchführbar sein. Die selektive Etablierung des Silylethers an C-3' sollte, wie schon in der Synthese der analogen Verbindung **114** gezeigt werden konnte, mühelos stattfinden. Da dann alle freien Sauerstofffunktionen der Verbindung, außer derjenigen, die oxidiert werden sollte, als Ether geschützt vorlägen, sollte eine Oxidation zum 4-

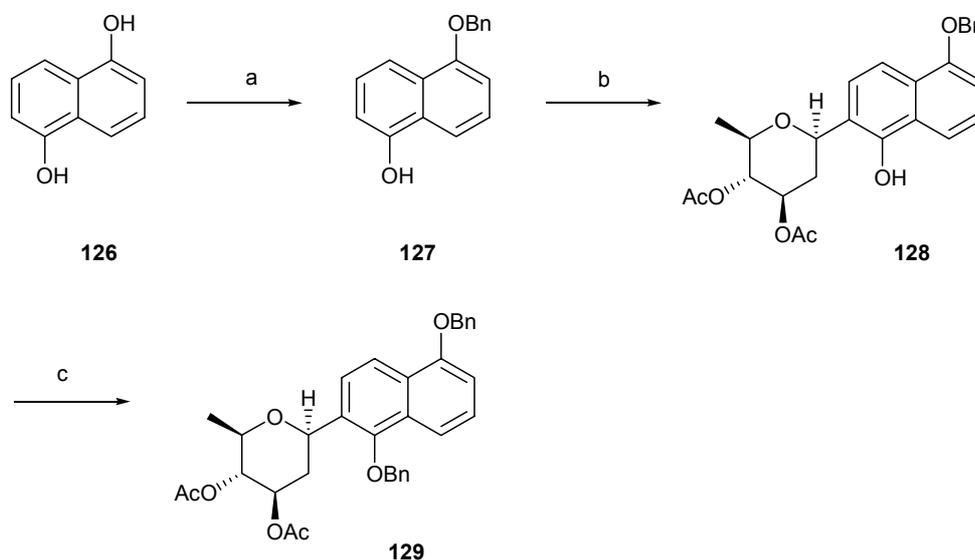
Ketozucker möglich sein. Für die anschließenden Entschützungen wurde die Reihenfolge bewusst so gewählt, dass der Silylether zuerst gespalten werden sollte, da hier eventuell Basen verwendet werden müssen und die freien Hydroxyfunktionen am Aromaten dies nicht tolerierten.



**Abbildung 66:** Geänderte Synthesestrategie zu C-Glycosid **95**

### 7.4.2 Synthese der Verbindung 129 ausgehend von 1,5-Dihydroxynaphthalin

Zunächst wurde das 1,5-Dihydroxynaphthalin, welches nicht basenempfindlich ist, mit  $K_2CO_3$  in THF/DMF (1:1) zu Verbindung **127** umgesetzt. Dabei konnte eine Ausbeute von 34% nicht überschritten werden, da zugleich auch das dibenzylierte Produkt entstand. Der so erhaltene Aromat **127** konnte mit **112** in der Darstellung des C-Arylglycosids eingesetzt werden. Dabei zeigte sich, dass die Ausbeuten deutlich auf 12% sanken. So wurden die Reaktionsbedingungen abermals angepasst und das Lösungsmittel, wie in der Literatur von Matsumoto *et al*<sup>160</sup> beschrieben, auf Dichlormethan gewechselt. Auch die Reaktionsbedingungen wurden, nach ersten Versuchen mit nur wenig verbesserter Ausbeute noch einmal angepasst. So wurde das  $BF_3 \cdot Et_2O$  bei  $-30^\circ C$  über einen Zeitraum von 60 Minuten in Dichlormethan verdünnt zugetropft. Die Reaktion wurde dann innerhalb von 10 Std. auf Raumtemperatur erwärmt und dann aufgearbeitet. Hierbei wurden zwei Produkte isoliert, wobei vermutet wurde, dass es sich hierbei um das gewünschte Produkt und das *para*-Produkt handelte. Wie sich nach NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigte, konnte neben der Verbindung **128** zusätzlich das intermediär entstehende  $\alpha$ -C-Glycosid isoliert werden.



**Schema 23:** Reagenzien und Bedingungen: a) BnBr,  $K_2CO_3$ , THF/DMF, RT, (34%); b) 1,3,4-Tri-O-acetyl-D-rhamnal,  $BF_3 \cdot Et_2O$ ,  $CH_2Cl_2$ ,  $-30^\circ C \rightarrow RT$ , (39%); c) BnBr, TBAI,  $Ag_2O$ , THF,  $0^\circ C$ , (86%).

<sup>160</sup> T. Matsumoto, M. Kasuki, H. Jona, K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6982 – 6992.

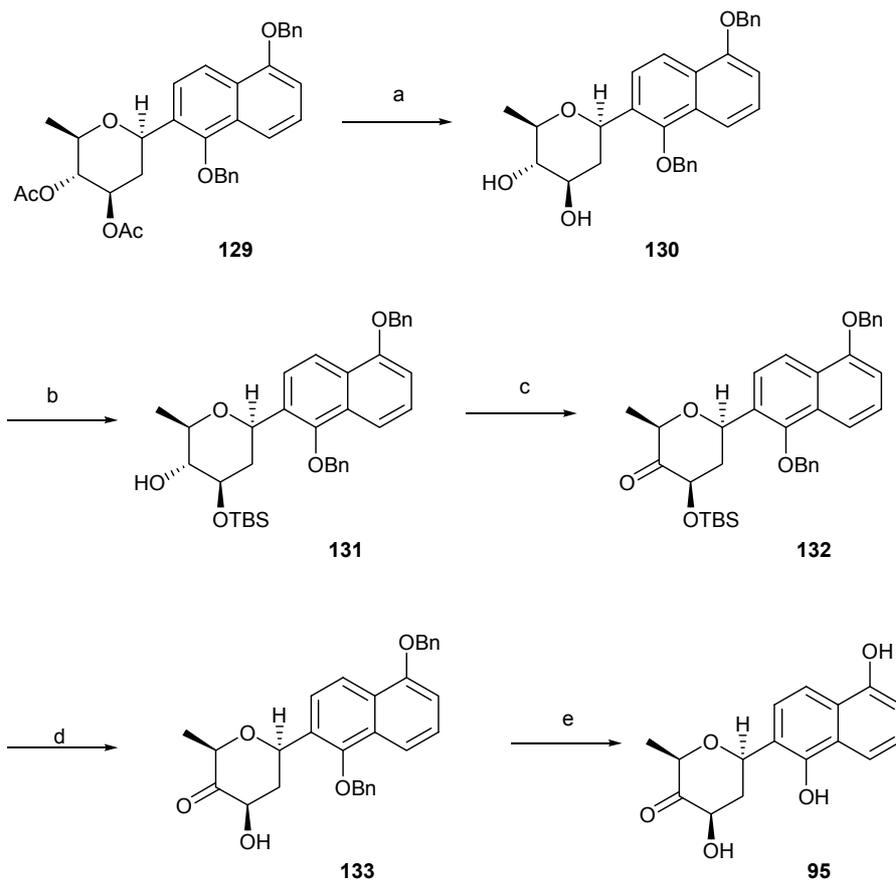
Die Reaktionszeit wurde daraufhin um weitere 12 Std. bei Raumtemperatur verlängert, bis das  $\alpha$ -C-Glycosid mittels Dünnschichtchromatographie nicht mehr nachzuweisen war. Das Glycosid **128** konnte in einer Ausbeute von 39% isoliert werden und wurde anschließend unter milden Bedingungen mit  $\text{Ag}_2\text{O}$  und Benzylbromid in Anwesenheit von TBAI, in 86% Ausbeute benzyliert.

#### 7.4.3 Synthese des Arylglycosids **95** ausgehend von **129**

Das vollständig geschützte C-Arylglycosid **129** sollte nun deacetyliert werden. Da der Aromat keine freien Hydroxyfunktionen besitzt, wurde hier zunächst auf basische Verseifungsmethoden zurückgegriffen. Die Entschützung mit NaOMe gelang auf Anhieb und verlief innerhalb von 16 Std. vollständig. Die nachfolgende Synthese des Silylethers **131** verlief analog der Vorgehensweise bei **114** in einer Ausbeute von 91%. Die anschließende Oxidation zu **132**, welche in der vorhergehenden Synthesestrategie nicht zum Ziel geführt hatte, sollte zunächst mit Dess-Martin-Periodinan<sup>161</sup> durchgeführt werden und führte im ersten Versuch in einer guten Ausbeute von 81% zum 4-Ketozucker **132**. Die nun angestrebte Spaltung des Silylethers zu **133** wurde zunächst mit TABF in THF, später auch mit Zugabe von Essigsäure durchgeführt und führte immer zur Zersetzung des Edukts. Schließlich erfolgte die Entschützung im schwach sauren Milieu ohne Zusatz einer Base mit HF·Pyridin in 48 Std. wobei das desilylierte Produkt in einer Ausbeute von 81% anfiel. Die nun fehlende finale Debenzylierung verlief auf Anhieb mit  $\text{Pd/C/H}_2$  in Methanol in einer Ausbeute von 57%, wobei 38% des Edukts reisoliert und erneut eingesetzt werden konnte. Der Baustein **95** für die Verfütterungsexperimente lag nun vor

---

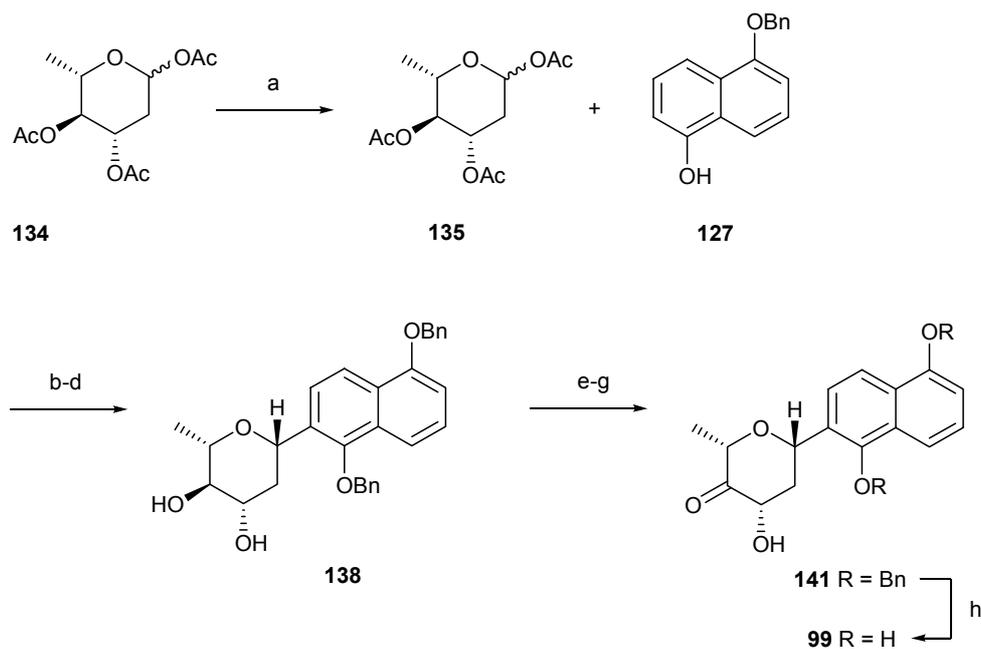
<sup>161</sup> D. B. Dess, J. C. Martin, J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 7277 – 7287.



**Schema 24:** Reagenzien und Bedingungen: a) NaOMe, MeOH, RT, (99%);  
b) TBS-OTf, 2,6-Lutidin, DMF, RT, (91%); c) DMP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT,  
(81%); d) HF·Py, THF, RT, (81%); e) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, (57%).

### 7.5 Synthese von 96 ausgehend von 3,4,-Di-O-acetyl-L-rhamnal (134) und 127

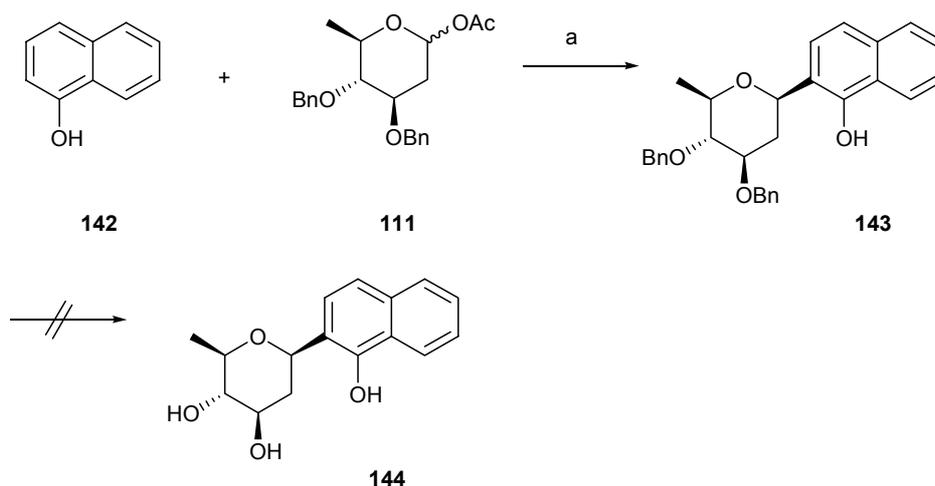
Die Synthese des enantiomeren Arylglycosids **99** ausgehend von 3,4-Di-O-acetyl-L-rhamnal (Dargestellt von J. Jaunzems), verlief analog zur Synthese von **95** aus 3,4-Di-O-acetyl-D-olvisie mit vergleichbaren Ausbeuten. Deshalb wird hier auf eine genaue Beschreibung der Synthese verzichtet. Das Endprodukt **99** konnte schließlich ausgehend von 134 in einer Gesamtausbeute von 11% über 8 Stufen erhalten werden.



**Schema 25:** Reagenzien und Bedingungen: a)  $\text{PPh}_3\text{HBr}$  0.25 Äq,  $\text{AcOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , (67%); b)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-30^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , (56%); c)  $\text{BnBr}$ ,  $\text{TBAI}$ ,  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{THF}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , (91%); d)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{RT}$ , (99%); e)  $\text{TBS-OTf}$ ,  $2,6\text{-Lutidin}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $\text{RT}$ , (80%); f)  $\text{DMP}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{RT}$ , (95%); g)  $\text{HF} \cdot \text{Py}$ ,  $\text{THF}$ ,  $\text{RT}$ , (65%); h)  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{MeOH}$ , (54%).

## 7.6 Synthese des Arylglycosids **94** ausgehend von 3,4,-Di-O-acetyl-D-rhamnal und 1-Naphthol

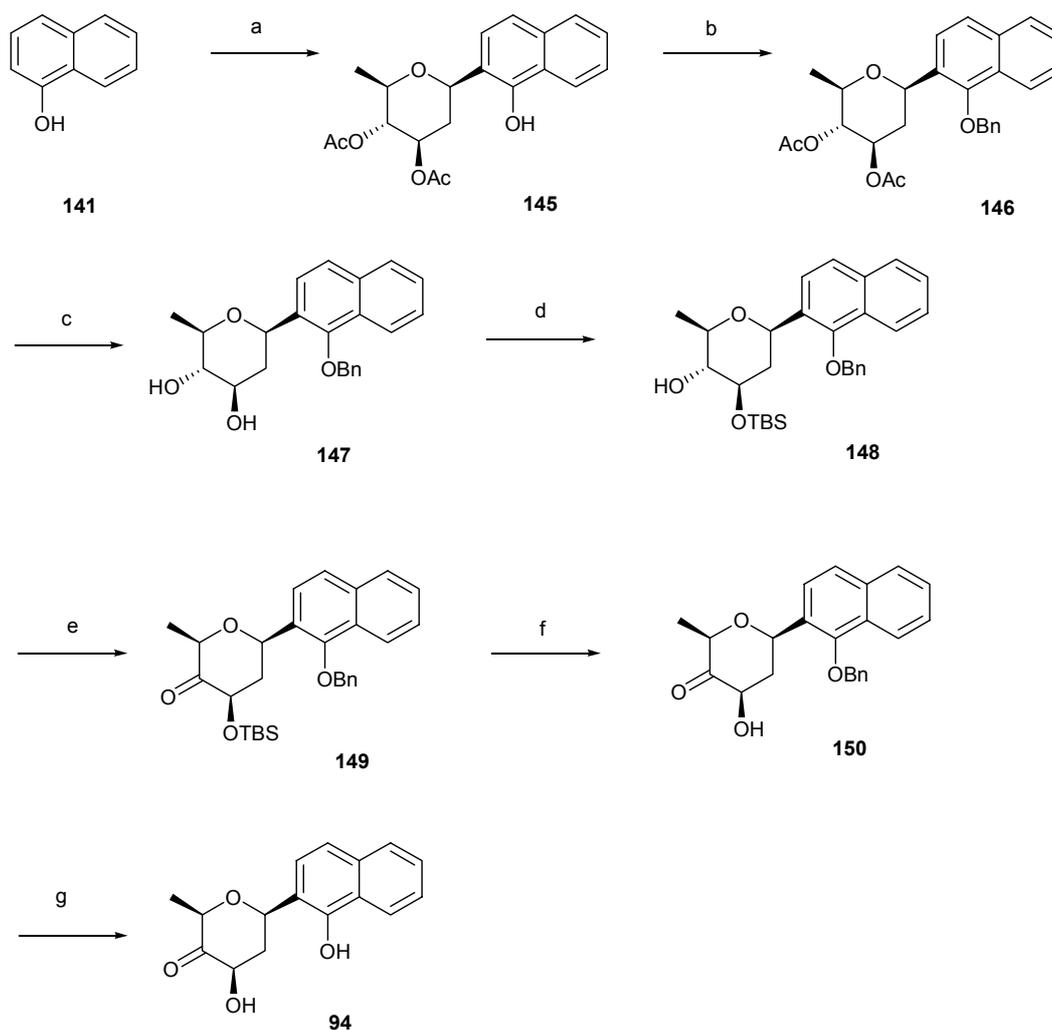
Parallel zu den Bemühungen den Biosynthesevorläufer **95** aus **111** zu synthetisieren wurden auch Versuche zur Synthese **94** aus **111** durchgeführt. Wie auch in der Synthese zu **95**, wurde hier die Glycosylierung des Aromaten erfolgreich durchgeführt. Da sich **143** nicht zu **144** debenzylieren ließ, musste diese Route aufgegeben werden (Schema 26).



**Schema 26:** Reagenzien und Bedingungen: a)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 55%.

So wurde die Synthese analog zu den Studien aus Kapitel 7.4 zur Synthese von **95** weitergeführt. Die dort ausgearbeitete Strategie führte auch hier zum gewünschten Ergebnis (Schema 27).

Entgegen der Befürchtung, dass hier durch den fehlenden sterisch anspruchsvollen Benzylether am Aromaten wieder das *para*-Produkt der Glycosylierung auftreten könnte, konnte es hier ebenso wenig nachgewiesen werden, wie schon bei der Darstellung von **120** und **136**. Auch hier konnte die Bildung des  $\alpha$ -C-Glycosids und dessen Umlagerung zum  $\beta$ -C-Glycosid per Dünnschichtchromatographie verfolgt werden. Die Ausbeute lag mit 44% sogar etwas höher als bei der Glycosylierung von **127**.

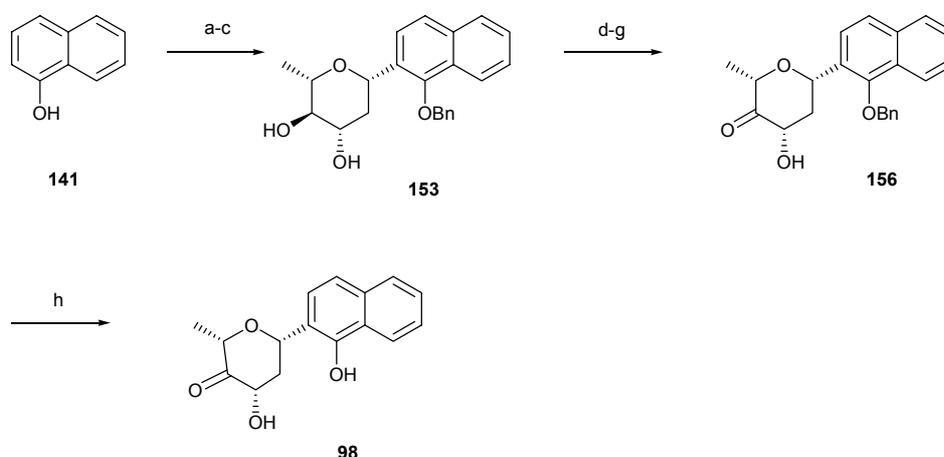


**Schema 27:** Reagenzien und Bedingungen: a)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , 1,3,4-Tri-O-acetyl-D-rhamnal,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-30^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , (44%); b)  $\text{BnBr}$ , TBAI,  $\text{Ag}_2\text{O}$ , THF,  $0^\circ\text{C}$ , (93%); c)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ , RT, (99%); d) TBS-OTf, 2,6-Lutidin, DMF, RT, (91%); e) DMP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, (91%); f) HF·Py, THF, RT, (70%); h) Pd/C,  $\text{H}_2$ ,  $\text{MeOH}$ , (43%).

### 7.7 Synthese des Arylglycosids **98** ausgehend von 3,4,-Di-O-acetyl-L-rhamnal und 1-Naphthol

Die Synthese des enantiomeren Arylglycosids **98** ausgehend von 3,4-Di-O-acetyl-L-rhamnal, verlief analog zur Synthese von **94** aus 3,4-Di-O-acetyl-D-olivose. Die isolierten Ausbeuten der Einzelschritte waren vergleichbar. Deshalb wird hier von einer genauen

Beschreibung der Synthese abgesehen. Das Endprodukt **98** konnte so ausgehend von **141** in einer Gesamtausbeute von 14% über 7 Stufen erhalten werden.

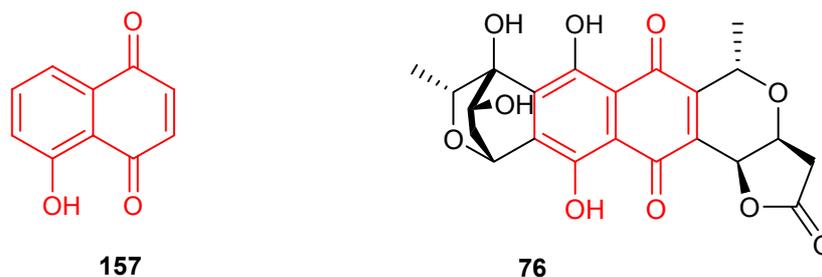


**Schema 28:** Reagenzien und Bedingungen: a)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , 1,3,4-Tri-O-acetyl-L-rhamninal,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-30 \rightarrow \text{RT}$ , (57%); b)  $\text{BnBr}$ , TBAI,  $\text{Ag}_2\text{O}$ , THF,  $0^\circ\text{C}$ , (91%); c)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ , RT, (96%); d)  $\text{TBS-OTf}$ , 2,6-Lutidin, DMF, RT, (80%); e)  $\text{DMP}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, (92%); f)  $\text{HF} \cdot \text{Py}$ , THF, RT, (98%); h)  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{MeOH}$ , (45%).

## 7.8 Studien zur Synthese eines arylglycosidischen Vorläufers mit verändertem Oxidationsmuster am Aromaten

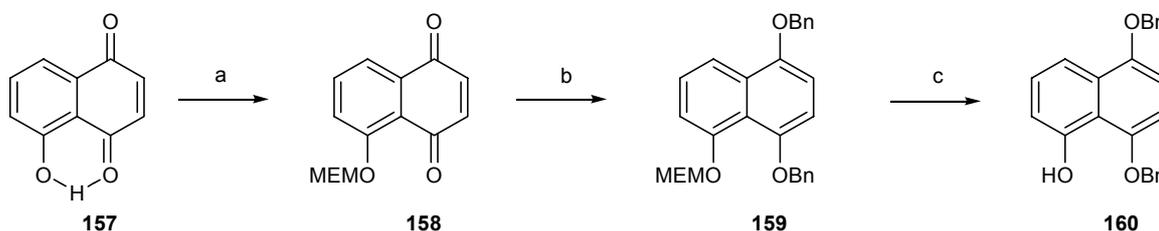
Da nicht sicher gestellt war, dass die synthetischen Verbindungen **94**, **95**, **98** und **99** aufgrund der, gegenüber dem Naturstoff Granaticin, geringeren Sauerstoffdichte am aromatischen System bei der Verfütterung akzeptiert werden würden, sollte ein dem Naturstoff ähnlicheres System aufgebaut werden. Hierzu sollte eine von Matsuo *et al.*<sup>162</sup> vorgestellte Methode zur C-Glycosylierung mit vollständig ungeschützten Zuckern verwendet werden. Als zu glycosylierender Aromat fiel die Wahl auf Juglon **157**, da dieses die erforderlichen Sauerstofffunktionen besitzt. Da auch der Naturstoff in Nachbarschaft zum Glycan eine chinoide Struktur besitzt (Abbildung 67).

<sup>162</sup> G. Matsuo, Y. Miki, M. Nakata, S. Matsumura, K. Toshima, Chem. Commun., 1996, 2371 - 2374.



**Abbildung 67:** strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Juglon **157** und Granaticin **76**

Die direkte Glycosylierung von Juglon konnte weder mit dem Glycosyldonor **111** noch mit der freien D-Olucose **161** erfolgreich durchgeführt werden, da die Nucleophilie des chelatisierten Phenols in Juglon **157** nicht ausreicht, um das protonierte Glycal anzugreifen<sup>163</sup>. Das chinoid System muss zuvor reduziert und, da es sich sehr leicht reoxidieren lässt, stabilisiert werden. Zunächst wurde daher die phenolische Hydroxylgruppe mit MEM-Cl zum entsprechenden Ether **158** umgesetzt.



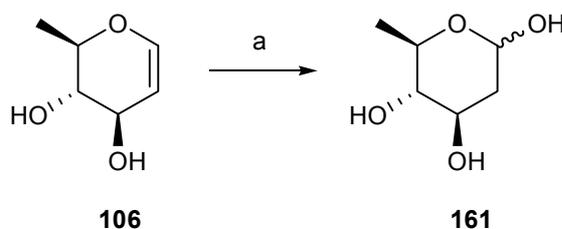
**Schema 29:** a) MEM-Cl,  $i$ PrNEt<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C→RT; b) Pd/C, H<sub>2</sub>, Essigsäureethylester, dann NaH, BnBr, DMF, RT; c) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT

Im Anschluss wurde Chinon **158** mit H<sub>2</sub> in Anwesenheit von Pd/C reduziert. Da das gebildete Produkt sehr oxidationsempfindlich war und an Luft wieder zum Chinon **158** zurück reagiert, wurden die entstehenden Hydroxygruppen sofort Benzyl-geschützt **159**. Zur Glycosylierung des Aromaten musste der MEM-Ether wieder gespalten werden, um die freie Hydroxygruppe für die Bildung des intermediär entstehenden O-Glycosids verwenden zu können. Die Spaltung des Ethers mit TFA führte in moderaten Ausbeuten zum gewünschten Produkt **160**. Der so erhaltene Aromat konnte nun für die

<sup>163</sup> G. Dräger, *Dissertation*, Technische Universität Clausthal, **1997**.

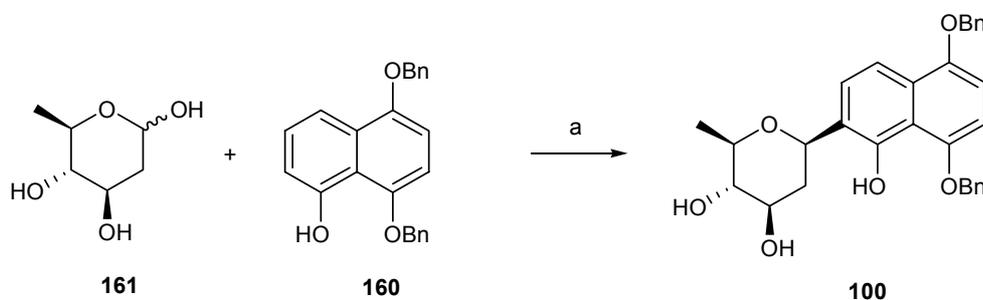
Glycosylierung mit D-Olivose eingesetzt werden. Wieder handelte es sich hierbei um eine Lewisäure vermittelte Kupplungsreaktion, die nach dem in Kapitel 7.1.2.2 beschriebenen Mechanismus ablief.

Die hier als Glycosyldonor dienende D-Olivose wurde durch eine säurekatalysierte Addition von Wasser an die Doppelbindung in einer Ausbeute von 35% dargestellt.



**Schema 30:** Reagenzien und Bedingungen: a) HCl (1M), CH<sub>3</sub>CN, (35%).

Die anschließende Glycosylierung wurde in Acetonitril bei RT durchgeführt. Als Katalysator diente hierbei TMS-OTf (Schema 31). Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 6% isoliert werden.



**Schema 31:** Reagenzien und Bedingungen: a) TMS-OTf, CH<sub>3</sub>CN, 0→RT, (6%).

Diese Umsetzung ist so ineffizient, dass die Synthese des Vorläufers auf dieser Stufe aufgegeben wurde.

## 7.9 Vorläufer-Dirigierte Biosynthese mit den Bausteinen 94, 95, 98 und 99

Aus zeitlichen Gründen wurde hier für jeden Baustein nur eine einzige Verfütterung durchgeführt. Diese konnten nicht optimiert werden. Um dennoch eine genaue Vorstellung des zeitlichen Ablaufs zur Produktion von Granaticin in *S. violaceoruber* zu bekommen, musste zunächst eine Fermentationskontrolle durchgeführt werden, in der per HPLC<sup>164</sup> die zeitabhängige Produktion von Granaticin in verschiedenen Medien beobachtet wurde. Hierzu wurde *Streptomyces violaceoruber* Tü 22, wie in Kapitel 9.20 beschrieben, kultiviert. Das geeignetste Medium besteht aus Glucose, Hefe- und Malzextrakt. Die Produktion von Granaticin ist durch eine Violettfärbung des Kulturmediums auch visuell zu beobachten. Die Verfütterungen fanden in drei Teilen statt, in denen je ein Drittel der Biosynthesevorläufer zum Produktionsmedium zugesetzt wurden. Zusätzlich wurde eine Kultur ohne Verfütterung eines Vorläufers zum Vergleich fermentiert. Die Fütterungen wurden in Abständen von 16 Std. durchgeführt, beginnend mit der ersten Verfärbung des Mediums nach 17 Std.. Zwei Stunden nach der letzten Verfütterung wurde die erste Probe für spektroskopische Untersuchungen entnommen und dann alle 24 Std. eine weitere. Zur Beobachtung der Abnahme des Biosynthesevorläufers im Medium wurden mit der Blindprobe vergleichende HPLC-Messungen durchgeführt. Dabei wurde die Bildung neuer Peaks beobachtet, die aber bis zu Zellernte nach 50 Std. wieder verschwanden (Abbildungen 68-70).

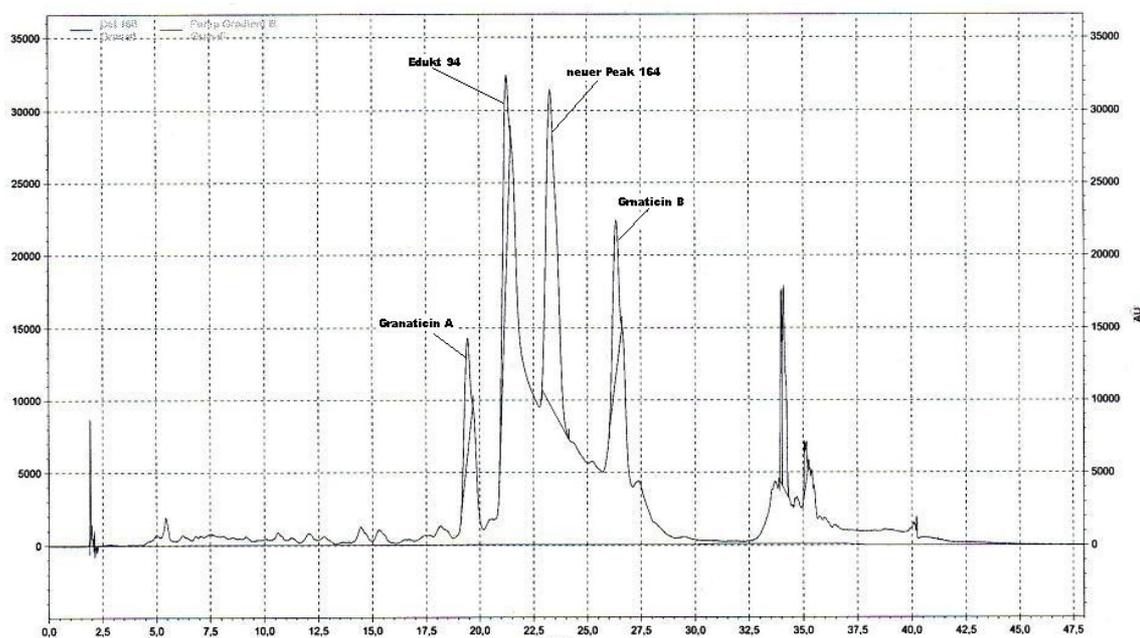


Abbildung 68: 1. HPLC-Messung, 2 Std. nach letzter Fütterung, Absorption UV 280 nm

<sup>164</sup> L. M. Pham, J. Vater, W. Rotard, C. Mügge, *J. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 710 – 723.

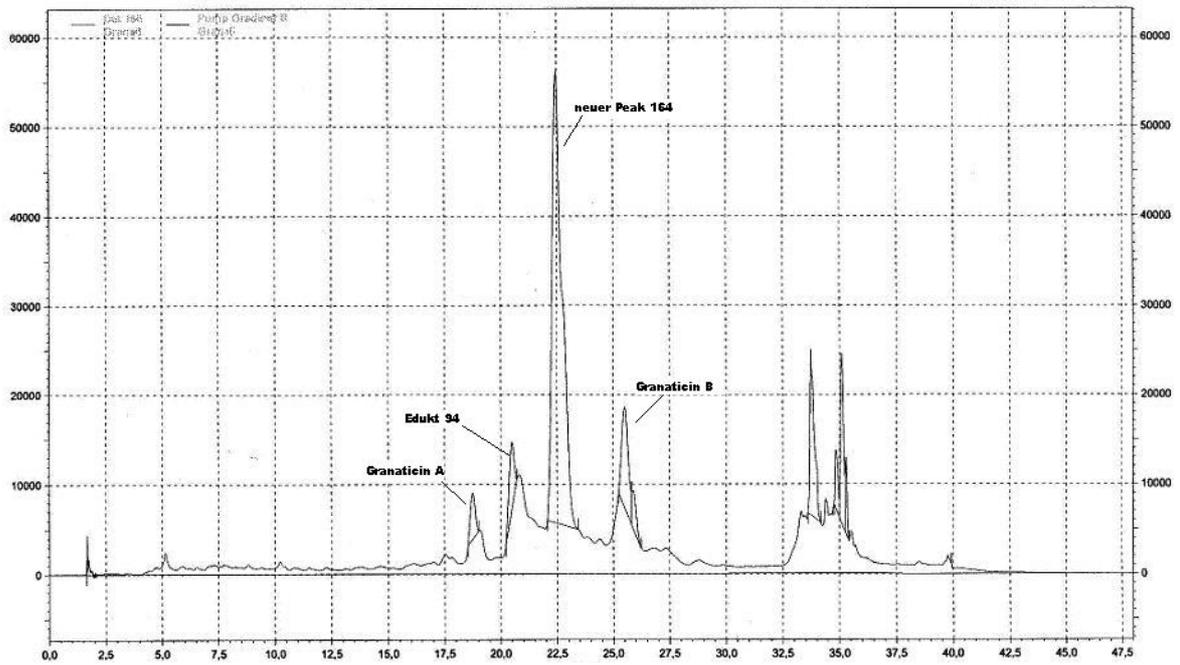


Abbildung 69: 2. HPLC-Messung, 26 Std. nach letzter Fütterung, Absorption UV 280 nm

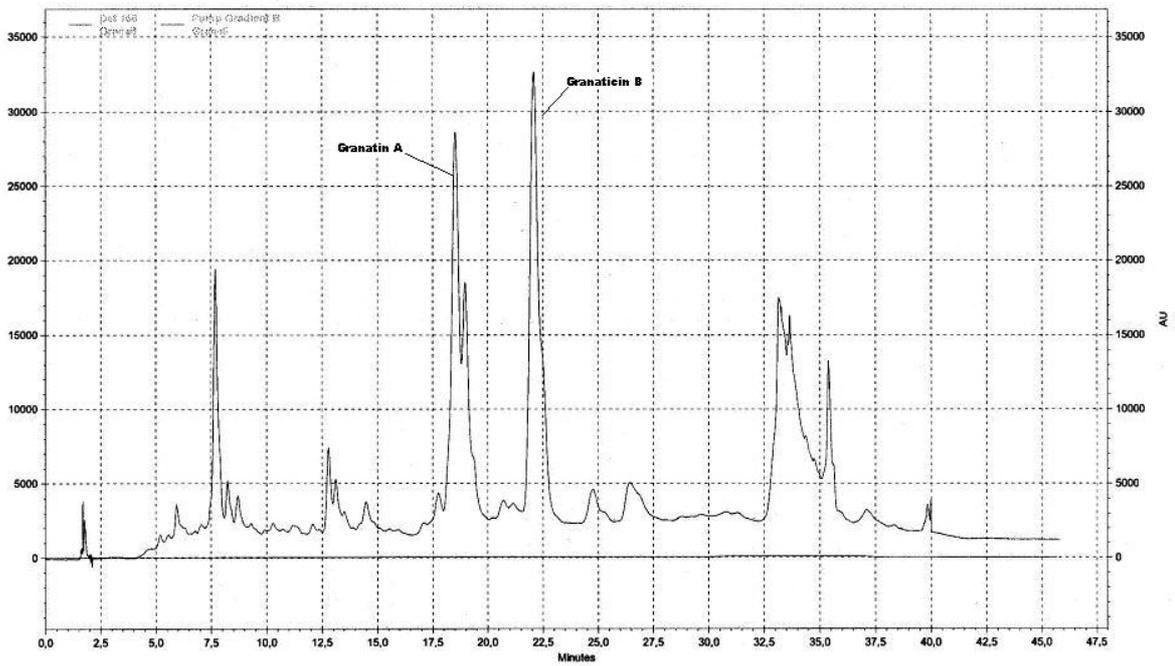
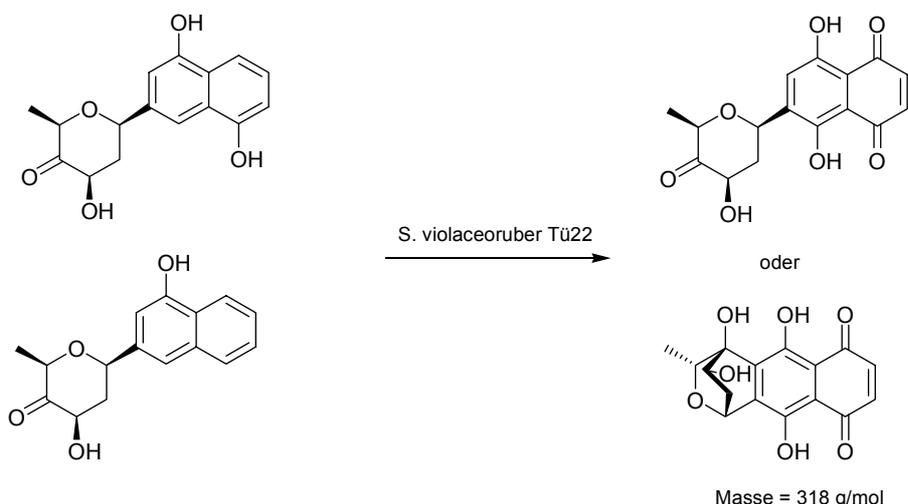


Abbildung 70: 2. HPLC-Messung, 50 Std. nach letzter Fütterung, Absorption UV 280 nm

Die Sekundärmetabolite wurden durch Extraktion der zellfreien Kulturbrühen mit Essigsäureethylester gewonnen. Erste MS-Spektren gaben aufgrund der vielen Inhaltsstoffe der Probe nur wenig Aufschluss über den Verbleib der Vorläufer. Anschließend wurden LC-MS Messungen durchgeführt, mit denen in zwei Proben mögliche Produkte, wie in Abbildung 54 angegeben, nachgewiesen werden konnten, die in der Blindprobe nicht auftraten. Dabei handelt es sich um die Masse  $(M-H)^- z = 317.0748$  g/mol.

Diese Masse lässt sich als das mögliche oxidierte aromatische System interpretieren, bei dem der Zucker unverändert in der 4-Ketoform vorliegt **162**, oder aber als Verbindung **163**, bei der der Ringschluss mittels einer Aldolase stattgefunden hat.

Für die endgültige Bestimmung der Struktur wurden präparative HPLC und HPCL-MS-Spektroskopie der gesammelten Fraktionen durchgeführt. Die, die Substanz beinhaltenden Fraktionen wurden wiederum per HPLC getrennt.

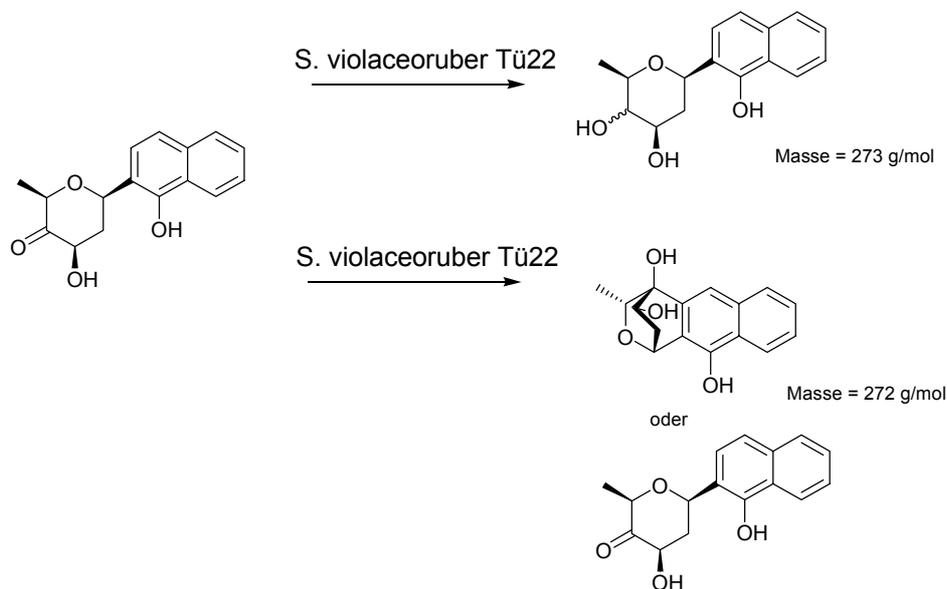


**Schema 32:** Mögliche Produkte der Vorläufer-Dirigierten Biosynthese mit **94** und **95**, detektiert über HPLC-MS aus dem Rohextrakt.

Nach Messungen von hochauflösender HPLC-Massenspektren stellte sich heraus, dass die Substanz mit der Masse  $(M-H)^- = 317.1348$  g/mol nicht das erwartete oxidierte oder ringgeschlossene Produkt war. Es handelte sich vielmehr um eine Verbindung mit der Summenformel  $C_{18}H_{22}NO_4$ .

Um dennoch eine Aussage über den Verbleib der eingesetzten Arylglucoside treffen zu können, wurden schließlich Rückstellproben, die 2 bzw. 26 Stunden nach der letzten Verfütterung entnommen wurden untersucht.

Durch Messungen von HPLC-MS-Spektren dieser Proben konnten zwei Peaks mit der Masse des Edukts (271.0970 g/mol) nachgewiesen werden und ein Produkt, welches eine Reduktion der Ketogruppe vermuten ließ. Eine Reduktion der Ketogruppe würde auch den neuen intensiven aufgetretenen Peak, einer polareren Substanz in der zuvor durchgeführten HPLC-Messung erklären.

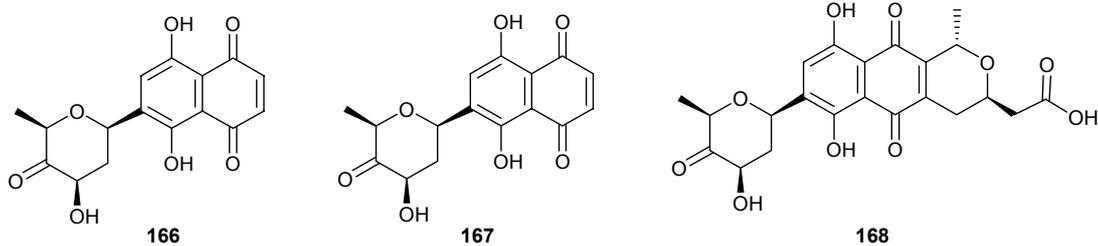


**Abbildung 71:** Metabolisierung von 94 durch *S. violaceoruber* Tü 22

Zwischen der 26. und 50. Stunde muss das reduzierte Produkt **164** dann metabolisiert worden sein, da es in den Proben nach der Aufarbeitung der Kulturbrühen nicht mehr nachzuweisen war. Eine Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  zur Probe sollte klären, ob einer der beiden Peaks mit der Eduktmasse eventuell das schon ringgeschlossene Produkt **165** war. Es wäre durch  $\text{NaBH}_4$  nicht reduzierbar. Anschließende HPLC-MS-Messungen zeigten jedoch nur noch das Produkt mit der Masse  $(\text{M}-\text{H})^- z = 273.1302$  g/mol, welches der Verbindung **164** entspricht.

Die Versuche haben gezeigt, dass *S. violaceoruber* die dargestellten Bausteine nicht zum gewünschten Produkt umsetzt. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist dies auf das unpassende Oxidationsmuster der aromatischen Ringsysteme zurückzuführen. Zur Überprüfung dessen sollten die Verfütterungsversuche mit höher oxidierten C-Arylglycosiden z. B. **158** und **159** wiederholt werden, was hier aus zeitlichen Gründen nicht mehr realisiert werden konnte.

Da diese chinoiden Systeme sehr reaktiv<sup>165</sup> sind, ist es fraglich, ob sie eine Verfütterung schadlos überstehen.



**Abbildung 72:** Erfolgversprechende Biosynthesevorläufer

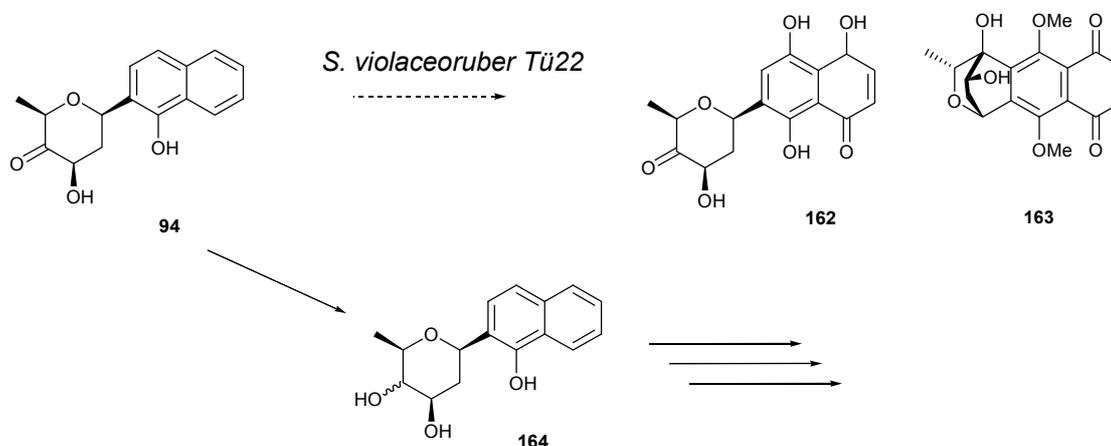
Die größten Erfolgsaussichten, nach einer Optimierung des Fermentationsprotokolls, von *S. violaceoruber* akzeptiert zu werden, hat das dem GranaticinGrundgerüst entsprechenden Substrat **168**. Eine Verfütterung dieses Substrates würde allerdings die Schwierigkeit mit sich bringen, dass das erhaltene Produkt nicht von dem durch den Wildtyp über die PKS II synthetisierten Granaticin unterscheidbar wäre. So könnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob der Biosynthesevorläufer zu Granaticin transformiert wurde, oder metabolisiert und deshalb nicht mehr nachweisbar ist.

<sup>165</sup> T. J. Monks, D. C. Jones, *Curr. Drug Metabol.*, **2004**,3, 425 – 438.

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen ausgehend von den Tri-O-acetyl-D-glucalen **91** und **92**, bzw. Di-O-acetyl-L-rhannalen **95** und **96**, einen generellen Syntheseweg zu verschiedenen C-glycosidischen putativen Biosynthesevorläufern für Granaticin zu erarbeiten. Die Synthesen der Glycoside mit den natürlich vorkommenden D-Zuckern umfassen 12 Stufen. Die Synthesen der Glycoside mit dem nicht natürlich auftretenden L-Zuckern umfassen ausgehend vom zur Verfügung stehenden Vorläufer **132** 8 Stufen. Die von Suzuki *et al.* vorgestellten Glycosylierungsmethoden zu Darstellung von C-Arylglycosiden konnten erfolgreich angewendet werden. Die von Suzuki ausgeschlossene Bildung der *para*-C-Arylglycoside konnte während der Synthese widerlegt werden. Dabei zeigte sich, dass zur Durchführbarkeit der Synthesen die phenolischen Hydroxygruppen geschützt vorliegen müssen.

Die Verfütterungsversuche haben gezeigt, dass *S. violaceoruber* Tü 22 keinen der verfütterten Bausteine mit dem Post-PKS Enzymen zum oxidierten (**154**) bzw., ringgeschlossenen Produkt **155** umsetzt. Sie wurden während der Fermentation an C-4' des Zuckers zum Glycosid **156** reduziert und dann metabolisiert (Abbildung 73).

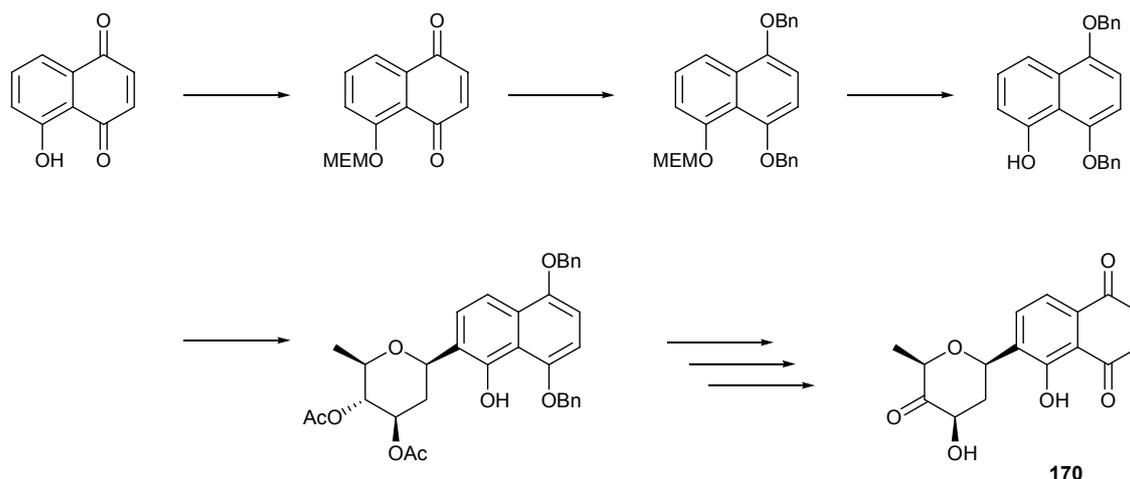


**Abbildung 73:** Verbleib der C-Arylglycoside während der Fermentation von *S. violaceoruber*

Da die Verfütterungsexperimente aus zeitlichen Gründen nur ein einziges Mal durchgeführt wurden, muss zukünftig, anhand des hier erstellten Fermentationsprotokolls, eine Optimierung dieser Experimente durchgeführt werden. Die Fütterung der Bausteine sollte nach Beginn der Bildung von Granaticin, welche durch die Verfärbung des Kulturmediums beobachtet werden kann, in einem Schritt erfolgen. Die Ernte der Zellen und damit die Gewinnung der Sekundärmetaboliten sollte ca. 24 Std. spätesens 30 Std.

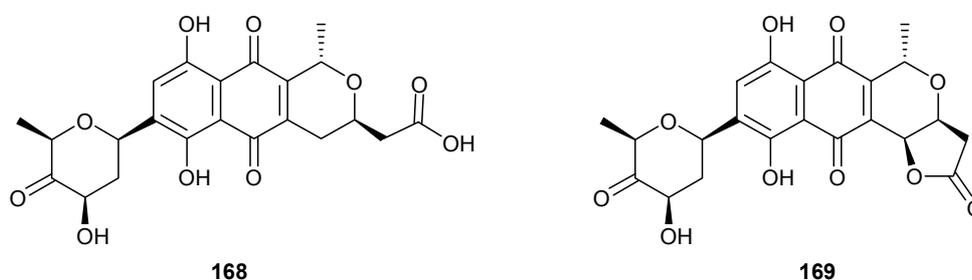
nach der Verfüterung erfolgen, damit auftretende Abbauprodukte besser identifizierbar sind. Die erstellten HPLC und LC-MS-Protokolle sollten für diese Experimente als Anhaltspunkte genutzt werden und bedürfen vermutlich nur geringer Anpassungen.

Die hier ausgearbeitete Syntheseroute kann – in Kombination mit dem Syntheseweg zu Glycosid **100** - genutzt werden, um Biosynthesevorläufer mit höher oxidierten Aromaten z.B. **170** darzustellen (Abbildung 74), deren Akzeptanz durch das Bakterium deutlich größer sein sollte.



**Abbildung 74:** Synthese zu einem wahrscheinlich besser akzeptierten Biosynthesevorläufer

Die größte Wahrscheinlichkeit zur Akzeptanz durch *S. violaceoruber* Tü 22 haben Biosynthesevorläufer die dem Granaticingrundgerüst entsprechen (**168** und **169**). Da sie aber bei einer Biotransformation von den ebenfalls gebildeten Sekundärmetaboliten Granaticin A und Dehydrogranaticin nicht zu unterscheiden wären, würde eine eindeutige Klärung des Verbleibs der Vorläufer stark erschwert, wenn nicht unmöglich.



**Abbildung 75:** Dem Granaticingrundgerüst entsprechende Biosynthese-vorläufer

Eine Lösung für dieses Problem könnte die radioaktive Markierung der Vorläufer mit  $^{14}\text{C}$  sein, die eine deutliche Unterscheidung vom biosynthetisch gebildeten Granaticin

ermöglichen würde. Auch die Verwendung von  $^{13}\text{C}$  markierten Bausteinen würde im  $^{13}\text{C}$ -NMR eine Unterscheidung des transformierten Biosynthesevorläufers vom natürlich gebildeten Granaticin ermöglichen. Aber auch die Verwendung von Blockmutanten, bei denen die minimal-PKS nachweislich ausgeschaltet wurde, die nach-PKS Enzyme aber noch aktiv sind, könnte hier die Lösung sein. So bestünde nicht die Schwierigkeit einer Unterscheidung zwischen voll biosynthetisch dargestelltem Granaticin und dem transformierten Biosynthesevorläufer.

## 9. Experimenteller Teil

### 9.1 Allgemeines

#### Reaktionen

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in im Ölpumpenvakuum evakuierten Glasgeräten in einer sauerstofffreien, trockenen Stickstoff- oder Argonatmosphäre durchgeführt. Wenn erforderlich, wurden die Geräte zuvor im Vakuum ausgeheizt. Wenn nicht anders angegeben wurde mit einem Magnetrührer gerührt.

#### Lösungsmittel und Reagenzien

Lösungsmittel für den Einsatz in feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden nach Standardverfahren getrocknet<sup>166</sup> und unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt bzw. frisch destilliert eingesetzt.

Diethylether (Et<sub>2</sub>O), Tetrahydrofuran (THF): Trocknen durch Rückfluss über Natriumdraht, als Feuchtigkeits- und Sauerstoffindikator diente Benzophenon.

Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): Trocknen durch Rückfluss über Calciumhydrid.

Alle weiteren absoluten Lösungsmittel wurden gekauft und wie geliefert ohne weitere Reinigung eingesetzt.

#### Flash- und Dünnschichtchromatographie

Qualitative Dünnschichtchromatogramme erfolgten auf Silicagel-beschichteten Aluminiumfolien 60 F<sub>254</sub> der Firma Merck. Der Nachweis der Substanzen geschah durch Fluoreszenzdetektion unter UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm, mittels Entwicklung durch Eintauchen in eine Lösung aus 6 g Anisaldehyd, 2.5 g konz. Schwefelsäure und 250 mL Ethanol mit anschließender Wärmebehandlung oder mittels Entwicklung durch

---

<sup>166</sup> D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd Ed., Pergamon Press Oxford **1988**.

Eintauchen in eine Lösung aus 3 g Kaliumpermanganat, 20 g Kaliumcarbonat, 5 mL 5 %- ge wässrige NaOH und 300 mL Wasser mit anschließender Wärmebehandlung<sup>167</sup>. Zur Flashchromatographie wurde Kieselgel der Korngröße 40-63  $\mu\text{m}$  der Firma J. T. Baker verwendet. Die eingesetzten Lösungsmittel wurden zuvor einfach destilliert, das verwendete Eluentenverhältnis ist in den entsprechenden Versuchsbeschreibungen angegeben.

### **Kernresonanzspektroskopie**

Die Kernresonanzspektren wurden an den Geräten AM-500, AVS-400 sowie DPX-200 der Firma Bruker erstellt. Falls nicht explizit angegeben, wurden die Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in  $\delta$ -Werten (ppm) angegeben, der Bezug ist bei den jeweiligen Messungen vermerkt. Für die Signalmultiplizität im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum werden folgende Abkürzungen verwendet: s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, quint: Quintett, m: Multiplett, b: verbreitert. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum werden die Kohlenstoffatome direkt als:  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ,  $\text{C}_q$  angegeben. Die Anzahl der an den jeweiligen Kernen  $\alpha$ -ständigen Wasserstoffatome wurde nach der DEPT 90/DEPT 135-Methode bestimmt. Wenn nötig wurden für eine vollständige Interpretation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Korrelationsspektren, HMBC-, HMQC- oder NOE-Experimente durchgeführt.

### **Gaschromatographie**

Zur analytischen Gaschromatographie wurde ein Gerät vom Typ HP 6890-II der Firma Hewlett Packard, bestückt mit einer SE-24-Kapillarsäule (25 m, Firma Macherey-Nagel) und Flammenionisator, verwendet; als Trägergas diente Stickstoff.

### **Infrarotspektroskopie**

IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Gerät Vector 22 der Firma Bruker gemessen, die Aufnahme der Spektren erfolgte über eine ATR-Einheit. Die Lage der

---

<sup>167</sup> J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis der Organischen Chemie*, Hrsg. der dt. Übersetzung G. Dyker, 2. Aufl., VCH-Verlag, Weinheim 1996, S. 144

Schwingungsbanden wird in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben, charakteristische oder besonders intensive Banden werden mit den Kürzeln b für breit oder s für stark versehen.

### **UV – VIS – Spektroskopie**

UV – VIS – Spektren wurden mit einem UV-VIS-Spektrometer UV-1601PC der Firma Shimadzu aufgenommen. Hierzu wurden Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil® (1.2 mL) der Firma Hellma verwendet. Als Standard diente das jeweilige Lösungsmittel, welches parallel gemessen wurde.

### **Massenspektrometrie**

Massenspektrometrische Analysen wurden entweder mit einem Finnigan MAT 312 bei einem Ionisierungspotential von 70 eV oder mit einem Micromass LCT mit Lock-Spray-Einheit (Injektion im Loop-Modus in eine HPLC-Anlage der Firma Waters, Alliance 2695) durchgeführt.

### **Drehwerte**

Spezifische optische Rotationen  $[\delta]$  wurden mit einem Polarimeter des Typs Perkin-Elmer 341 in einer 10 cm-Küvette bei  $\lambda = 589 \text{ nm}$  (Na-D-Linie) gemessen. Die Angabe der Drehwerte erfolgt in  $10^{-1} \text{ } ^\circ \text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ , wobei die Konzentration  $c$  definitionsgemäß in 10 mg/mL Lösung angegeben ist.

### **Zellaufschlüsse**

Zellaufschlüsse der Expressionsexperimente wurden mit einem Ultraschall Desintegrator „Sonifier II“ W- 250 „Classic“ mit konischer Ultraschallspitze der Firma Branson durchgeführt. Hierzu wurden die Kulturen 4 x 30 s bei 40 Watt unter Eiskühlung beschallt.

## HPLC

Als HPLC-Anlage wurde ein System von Merck-Hitachi, bestehend aus folgenden Komponenten verwendet: Pumpe: LaChrom L-7150; Detektor: Interface L-7000; Datensystem: Model 7000 Chromatography Data Station Software, Version 4.0; Aufgabeschleifen: 20  $\mu$ L (analytisch), 250  $\mu$ l (semipräparativ), 500  $\mu$ L (präparativ); Vorsäule: Trentec, repositil pur, 120 C18 AQ, 10  $\mu$ m, 30x20 mm (präparativ), Säule Trentec, Reprosill-Pur, 120 C18 AQ 5 $\mu$ m, 250x25 mm; LiChrosper 60, RP-select B (5 $\mu$ m)

### 9.2 Verwendete Puffer und andere Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Puffer mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hergestellt

#### IPTG

IPTG in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	20.0 mM
--	---------

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2  $\mu$ m Membranfilter).

#### Protein-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Folgende Puffer und Lösungen wurden zur Herstellung der Proteingele verwendet. Die Angaben gelten für die Verwendung der Mini-Vertikal-Doppel-Elektrophorese-Kammer (Carl Roth, Karlsruhe) und entsprechen den Angaben des Herstellers.

**Sammelgel (4 %)**

H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	1.48 mL
0,5 M Tris, pH 6.8 mit Eisessig	0.25 mL
10 % SDS	20.0 µL
Acrylamid 40 %	0.25 mL
10 % APS	20.0 µL
TMEDA	2.0 µL

**Trenngel (10 %)**

H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	2.41 mL
0.5 M Tris, pH 8.8 mit Eisessig	1.25 mL
10 % SDS	50.0 µL
Acrylamid 40 %	1.24 mL
10 % APS	50.0 µL
TEMED	2.0 µL

**Ladepuffer für Acrylamid-Gele**

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3.8 mL
0.5 M Tris, pH 6.8 mit Eisessig	2.5 mL
10 % SDS	10.0 mL
Glycerin	5.0 mL
2-Mercaptoethanol	0.4 mL
1 % Bromphenolblau	0.4 mL

**1x Laufpuffer für Acrylamid-Gele**

Tris	25.0 mM
L-Glycin	192.0 mM
SDS	3.5 mM

pH 8.3 mit NaOH<sub>fest</sub>**Entfärbelösung**

Ethanol	450 mL
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	450 mL
Eisessig	100 mL

**Färbelösung**

Coomassie Brilliant Blue G250	2.5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	450 mL
Ethanol	450 mL
Eisessig	100 mL

**Enzymaufreinigung und Enzym-Assay**

Folgende Puffer und Lösungen wurden zur Aufreinigung des heterolog exprimierten His-Tag-Proteins BAL eingesetzt. Die Zusammensetzungen entsprechen den Angaben im Handbuch der Firma Qiagen (QIAexpressionist)<sup>168</sup> zur Herstellung und Aufreinigung von Fusionsproteinen.

**Lysepuffer 1 (Lyse von *E. coli* zur Proteinisolierung)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
Glycerin	10 %

pH 8.0 mit NaOH

---

<sup>168</sup> <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/INT/ProteinExpression.aspx>: *The QIAexpressionist* (PDF), 2003.

### Waschpuffer (für Ni-NTA-Säulen)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
Glycerin	10 %

pH 8.0 mit NaOH

### Elutionspuffer (für Ni-NTA-Säulen)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
Glycerin	10 %

pH 8.0 mit NaOH

Der Anteil des Glycerins in den verschiedenen Puffern kann variieren. Sollte er abweichend der hier beschriebenen Menge sein, wird dies gesondert bei den jeweiligen Versuchen beschrieben.

### Beladung der Ni-NTA-Passflow-Säule sowie der losen Harze

Folgender Puffer wurde zur Beladung der Ni-NTA-Säulen und Harze mit aufgereinigten Enzymen verwendet.

**Lysepuffer 2**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM

pH 8.0 mit NaOH

**Reaktionspuffer 1 (für BAL-Experimente)**

Phosphatpuffer pH 7.0 (0.5 M)	1 mL
MgSO <sub>4</sub> -Lösung	1 mL
Thiamindiphosphat- Lösung (1.0 mM)	1 mL
DMSO	1 mL

Leitungswasser ad 10 mL

**Reaktionspuffer 2 (für gereinigte Enzyme)**

Phosphatpuffer pH 7.5 (0.5 M)	9 mL
MTB - Ether	1 mL

### 9.3 Verwendete Nährmedien

Die Angaben beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, jeweils auf 1 l Medium. Die Zusammensetzungen der meisten Medien entsprechen den Angaben in Hopwood et al.<sup>169</sup>, 1985 bzw. Sambrook et al.<sup>170</sup>, 1989. Den Festmedien wird vor dem Autoklavieren Agar zugesetzt. Antibiotika und andere hitzeempfindliche Substanzen wurden erst nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen hinzu gegeben.

#### LB-Medium

Trypton	10.0 g
Hefeextrakt	5.0 g
NaCl	5.0 g

Leitungswasser ad 1000 mL; pH 7.3 mit NaOH

#### HA-Medium

Glucose	4.0 g
Hefeextrakt	4.0 g
Malzextrakt	10.0 g

Leitungswasser ad 1000 mL; pH 7.5 mit NaOH

---

<sup>169</sup> D. A. Hopwood, J. M. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Burton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, H. Schrepf, *Genetic manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich, UK **1995**.

<sup>170</sup> J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **1989**.

**Medium 65**

Glucose	4.0 g
Hefeextrakt	4.0 g
Malzextrakt	10.0 g

Leitungswasser ad 1000 mL; pH 7.2 mit NaOH

**Medium 65 (Festmedium)**

Glucose	4.0 g
Hefeextrakt	4.0 g
Malzextrakt	10.0 g
CaCO <sub>3</sub>	2.0 g
Agar	12.0 g

Leitungswasser ad 1000 mL; pH 7.2 mit NaOH

**R-S-Medium**

Glucose	3.00 g
Casaminosäuren	0.04 g
Hefeextrakt	1.50 g
Tris	0.92 g
Agar	9.00 g

Leitungswasser ad 280 mL, pH 7.6 mit NaOH

$K_2SO_4$	0.08 mg
-----------	---------

Leitungswasser ad 10 mL

$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	3.04 g
-----------------------	--------

Leitungswasser ad 10 mL

Nach dem Autoklavieren werden die drei Lösungen vereinigt und es werden zugesetzt:

Spurenelemente- lösung	60 $\mu$ L
$K_2SO_4$ -Lösung (1%)	150 $\mu$ L
$CaCl_2$ -Lösung	120 $\mu$ L

### Spurenelement-Lösung für Streptomyceten<sup>171</sup>

$ZnCl_2$	40 mg
$CuCl_2$	7.7 mg
$MnCl_2$	10 mg
$Na_2B_4O_7$	5.3 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	10 mg

Leitungswasser ad 80 mL; pH 3.0 (HCl-Lösung (1M))

$FeCl_3$	200 mg
----------	--------

Leitungswasser ad 20 mL

Nach dem Vereinigen wird die Spurenelement – Lösung autoklaviert.

---

<sup>171</sup> T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Charter, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, UK, **2000**.

**NL19-Produktionsmedium**

Mannit	20 g
Sojamehl	20 g

Leitungswasser ad 1000 mL; pH 7.5 mit NaOH

**NL111-Produktionsmedium**

Lab. Lemco- Fleischextrakt	20.0 g
Malzextrakt	100.0 g
CaCO <sub>3</sub>	10.0 g

Leitungswasser ad 1000 mL; pH 7.2 mit NaOH

**9.4 Allgemeine Arbeitsmethoden****AAV1: Beladung der Harze mit dem Thyrosin-Linker**

Zu einer Lösung von 229 mg (0.6 mmol) des Thyrosin-Linkers in 15 mL DMF abs. werden 166 mg (1.2 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 130 mg (0.5 mmol) CsI und 200 mg (ca. 1 mmol Funktionalität) des entsprechenden Harzes gegeben. Die Reaktionsmischungen werden bei 60°C 72 Std. lang geschüttelt (75 rpm). Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung filtriert und das Harz mit H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan, MeOH, H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan (je 10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung wird gravimetrisch und per IR-Spektroskopie bestimmt.

### **AAV2: Verseifung des Tyrosin-Linkers am Harz**

Das mit dem Linker beladene Harz wird mit 10 mL H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) und 10 Äq LiOH versetzt. Die Reaktionsmischung wird 60 Std. bei 50°C geschüttelt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung filtriert und das Harz mit HCl (1 M), H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan, MeOH, H<sub>2</sub>O, HCl (1 M), H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan (je 10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung wird über die Masse und über IR Spektroskopie bestimmt.

### **AAV3: Beladung des NTA – Harzes mit Ni<sup>2+</sup>**

Zu einer gesättigten NiCl<sub>2</sub>-Lösung in H<sub>2</sub>O/DMSO (10:1) wird das jeweilige Harz gegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 min. bei RT geschüttelt. Im Anschluss wird das Harz abfiltriert und so lange mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen, bis das Wasser farblos ist.

### **AAV4: Beladung der Passflow-Säule mit den Linkern**

Zu einer Lösung aus 0.60 mmol Linker in 15 mL DMF werden 166 mg (1.20 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 130 mg (0.50 mmol) CsI gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 60°C 72 Std. im Kreislauf mit 1mL/min über einen Filter durch den Passflow-Reaktor gepumpt. Zur Aufarbeitung werden H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan, MeOH, H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan (je 10 mL) durch den Reaktor gepumpt und diese anschließend im Vakuum getrocknet.

### **AAV5: Verseifung der Linker in der Passflow-Säule**

Zur Verseifung im Passflow-Reaktor werden 20 mL H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) mit 99 mg (4.12 mmol) LiOH versetzt und 60 Std. bei 50°C im Kreislauf durch den Reaktor gepumpt. Zur Aufarbeitung wird der Reaktor mit HCl (1 M), H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan, MeOH, H<sub>2</sub>O, HCl (1 M), H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan (je 10 mL) gespült und im Vakuum getrocknet.

### **AAV6: Siliconisierung der Passflow-Säule**

50 mL einer 10%-igen Lösung von Dichlordimethylsilan in abs Dichlormethan. werden 60 Std. lang im Kreislauf bei 1 mL/min durch die Passflow-Säule gepumpt.

### **AAV7: Beladung des Passflow-Säule mit Ni<sup>2+</sup>**

20 mL einer gesättigten NiCl<sub>2</sub>-Lösung in H<sub>2</sub>O/DMSO (10:1) wird über Nacht bei RT im Kreislauf mit 1 mL/min durch den Reaktor gepumpt. Im Anschluss wird dieser so lange mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült bis das den Reaktor verlassene Wasser farblos ist.

### **AAV8: Bradford-Assey zur Bestimmung von Proteinmengen auf Ni-NTA Harzen**

Je 40 µL der vom Harz oder der Säule eluierten (je 1 mL) Lösungen werden mit 160 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und mit 800 µL des Farbstoffes Roti® - Nanoquant versetzt. Im Anschluss wird die Absorption der einzelnen Proben mittels eines UV-VIS Spektrometers bei 450 nm und 590 nm vermessen. Der Quotient der Absorption 450 nm/590 nm entspricht 1/5 der Konzentration des Enzyms in der jeweiligen Probe. Zu jedem Bradford-Assay wird eine Eichkurve aufgenommen.

Hierzu werden aus einer Stammlösung von BSA (100 µg/mL) und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> Lösungen (je 200 µL) verschiedener Konzentration (0, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg/mL) hergestellt und mit je 800 µL des frisch dargestellten Farbstoffes Roti®-Nanoquant versetzt. Im Anschluss wird die Absorption die einzelnen Proben mittels eines UV-VIS Spektrometers bei 450 nm und 590 nm vermessen. Der Quotient der Absorption 450 nm/590 nm wird ermittelt, und eine Eichgerade erstellt auf deren Grundlage die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt wird. Diese werden addiert und ergeben die Gesamtmenge des Proteins auf dem Harz oder der Säule.

### **AAV9: Beladung mit Zellyse (loses Harz)**

Bis zu 750 µL der zentrifugierten (10 min., 5000 rpm) Zellyse aus *E. coli* wird mit der gleichen Menge des Lysepuffer 1 versetzt und auf 100 mg mit Ni<sup>2+</sup> beladenes Ni-NTA-Harz gegeben. Dort wird die Mischung 1 min. ruhen gelassen und dann abgesaugt und aufgefangen. Das Harz wird noch weitere 2-mal mit je 1 mL Lysepuffer gewaschen. Im

Anschluss wird das Harz mit 4 x 1 mL Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine und Enzyme der Zellyse auszuwaschen. Im Anschluss wird mit 6 x 1 mL Elutionspuffer das Enzym mit dem His<sub>6</sub>-tag eluiert. Die jeweiligen Lösungen (je 1 mL) werden getrennt, in Eppendorf® Reaktionsgefäßen aufgefangen und die Enzymmenge mittels Bradford-Assay (**AAV8**) bestimmt.

Für Reaktionen entfallen die Elutionsschritte und das Bradford-Assay.

#### **AAV9-2: Beladung mit Zellyse (loses Harz)**

Bis zu 750 µL der zentrifugierten (10 min., 5000 rpm) Zellyse aus *E. coli* wird mit der gleichen Menge des Waschpuffers 1 (Imidazolkonzentration 10mM) versetzt und auf 100 mg mit Ni<sup>2+</sup> beladenes Ni-NTA-Harz gegeben. Dort wird die Mischung 1 min. ruhen gelassen, dann abgesaugt und aufgefangen. Das Harz wird noch weitere 2-mal mit je 1 mL Lysepuffer gewaschen. Im Anschluss wird das Harz mit 4 x 1 mL Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine und Enzyme der Zellyse auszuwaschen. Im Anschluss wird mit 6 x 1 mL Elutionspuffer das Enzym mit dem His<sub>6</sub>-tag eluiert. Die jeweiligen Lösungen (je 1 mL) werden getrennt, in Eppendorf® Reaktionsgefäßen aufgefangen und die Enzymmenge mittels Bradford-Assay (**AAV8**) bestimmt.

Für Reaktionen entfallen die Elutionsschritte und das Bradford-Assay.

#### **AAV10: Beladung mit gereinigten Enzymen (loses Harz)**

3 - 5 mg eines reinen Enzyms werden in 1 mL Lysepuffer 2 gelöst und auf 100 mg Ni-NTA-Harz gegeben. Dort wird die Mischung 1 min. ruhen gelassen und dann abgesaugt und aufgefangen. Es wird mit 2 x 1 mL Lysepuffer 2 gewaschen. Weitere Waschschrirte entfallen hierbei, da keine unspezifischen Bindungen auftreten. Das Enzym kann nun mit 6 x 1 mL Elutionspuffer eluiert werden. Die jeweiligen Lösungen (je 1 mL) werden getrennt in Eppendorf® Reaktionsgefäßen aufgefangen und die Enzymmenge mittels Bradford-Assay (**AAV8**) bestimmt.

Für Reaktionen entfallen die Elutionsschritte und das Bradford-Assay.

### **AAV11: Beladung mit Zellyse (Passflow-Säule)**

Bis zu 750 µL der zentrifugierten (10 min., 5000 rpm) Zellyse aus *E. coli* wird mit der gleichen Menge des Lysepuffer 1 versetzt und mit 0.5 mL/min durch die mit Ni<sup>2+</sup> beladene Passflow-Säule gepumpt. Die Säule wird noch weitere 3 x mit je 1 mL Lysepuffer 1 gewaschen. Im Anschluss wird die Säule mit 8 x 1 mL Waschpuffer gewaschen um unspezifisch gebundene Proteine und Enzyme der Zellyse auszuwaschen. Im Anschluss wird mit 16 x 1 mL Elutionspuffer das Enzym mit dem His<sub>6</sub>-Tag eluiert. Die jeweiligen Lösungen (je 1 mL) werden getrennt in Eppendorf® Reaktionsgefäßen aufgefangen und die Enzymmenge mittels Bradford-Assay (**AAV8**) bestimmt.

Für Reaktionen entfallen die Elutionsschritte und das Bradford-Assay.

### **AAV12: Beladung mit gereinigten Enzymen (Passflow-Säule)**

3-5 mg eines reinen Enzyms werden in 1 mL Lysepuffer 2 gelöst und mit 0.5 mL/min durch die mit Ni<sup>2+</sup> beladene PASSflow-Säule gepumpt. Es wird mit 3 x 1 mL Lysepuffer 2 gewaschen. Weitere Waschschrte entfallen hierbei, da keine unspezifischen Bindungen auftreten. Das Enzym kann nun mit 16 x 1 mL Elutionspuffer eluiert werden. Die jeweiligen Lösungen (je 1 mL) werden getrennt in Eppendorf® Reaktionsgefäßen aufgefangen und die Enzymmenge mittels Bradford-Assay (**AAV8**) bestimmt.

Für Reaktionen entfallen die Elutionsschritte und das Bradford-Assay.

### **AAV13: Bestimmung der Enzymreinheit durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)**

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli <sup>172</sup>, durchgeführt. Die Proteinauftrennung erfolgte in 10 %igen Polyacrylamidgelen (Gelgröße 73 x 80 x 0,5 mm) mit Hilfe einer Mini-Vertikal-Doppel-Elektrophorese-Kammer (Carl Roth, Karlsruhe) über 2.5 Std. bei 120 V. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in Kapitel 9.2 beschrieben. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Handbuch des Herstellers. 20 µL über Ni-NTA gereinigte Proteinlösung wurden mit 20 µL 1x Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel 3 min bei 100°C denaturiert. Nach dem Gel-Lauf wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mind. 3 Std. gefärbt, anschließend in

---

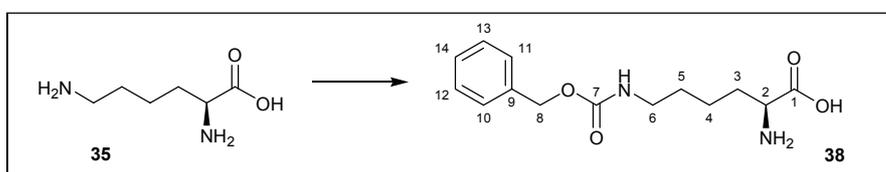
172 U. K. Laemmli, *Nature*, **1970**, 227, 680 – 685.

Entfärbelösung bis zum gewünschten Grad entfärbt. Zum Trocknen wurden die Gele zwischen zwei befeuchteten Cellophanpapieren möglichst blasenfrei in einen Geltrocknungsrahmen eingespannt und bei Raumtemperatur getrocknet.

## 9.5 Versuche zu Kapitel 3.1

### 9.5.1 Cbz-Schützung von Lysin

#### 2-Amino-6-benzyloxycarbonylamino-hexansäure (**38**)



Zu einer Lösung von 10.0 g (68.4 mmol) L-Lysin in 140 mL NaOH-Lösung (0.5 N) wird eine Lösung von 18.1 g (68.4 mmol)  $\text{CuSO}_4$  in 50 mL Wasser gegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss werden 150 mL Methanol und 17.5 g (102.6 mmol) Benzoylchlorid hinzu gegeben. Es wird weitere 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird der Niederschlag abfiltriert und 3-mal mit 25 mL Wasser, 2-mal mit 25 mL Methanol und 2-mal mit 25 mL MTB-Ether gewaschen. Der Rückstand wird luftgetrocknet und das trockene Produkt mit verdünnter HCl-Lösung (2 N) suspendiert und 20 min bei 50°C gerührt. Im Anschluss wird der Niederschlag noch einmal filtriert und noch ein weiteres Mal mit verdünnter HCl-Lösung suspendiert. Die Suspension wird 10 min bei 50°C gerührt und filtriert. Der Filterrückstand wird getrocknet. Die Ausbeute beträgt 14.8 g (52.7 mmol) = 77%.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  = 4.79 ppm):  $\delta$  = 7.27 – 7.20 (m, 5 H, -Cbz), 4.90 (s, 2 H, Cbz), 3.06 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2 H, H – 6), 2.93 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1 H, H – 2), 1.49 – 1.38 (m, 2 H, H – 3), 1.36 – 1.29 (m, 2 H, H – 5), 1.214 – 1.12 (m, 2 H, H – 4) ppm.

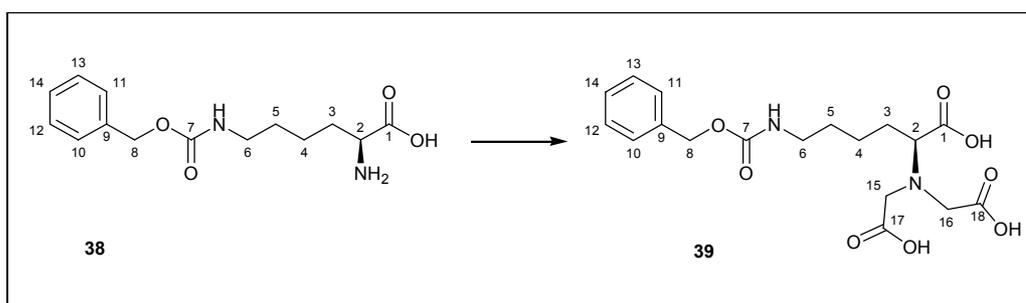
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 184.1 ( $\text{C}_q$ , C – 1), 158.6 ( $\text{C}_q$ , -Cbz), 136.8 ( $\text{C}_q$ , -Cbz), 129.0 (CH, -Cbz), 128.9 (CH, -Cbz), 128.6 ( $\text{C}_q$ , -Cbz), 66.9 ( $\text{CH}_2$ , -Cbz), 64.2 (CH, C – 2), 40.6 ( $\text{CH}_2$ , C – 6), 29.8 ( $\text{CH}_2$ , C – 3), 29.1 ( $\text{CH}_2$ , C – 5), 22.7 ( $\text{CH}_2$ , C – 4) ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 281.1501, gefunden: 281.1508.

Farbloser, amorpher Feststoff, C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> MG = 280.32 g/mol.

### 9.5.2 Alkylierung von O-Benzoyllysin

6-Benzyloxycarbonylamino-2-(bis-carboxymethyl-amino)-hexansäure (**39**)



Zu einer Lösung von 1.4 g (10.0 mmol) Bromessigsäure in 10 mL NaOH (2 N), wird bei 0°C eine Lösung von 981 mg (3.50 mmol) 2-Amino-6-benzyloxycarbonylamino-hexansäure in 15 mL NaOH (2 N) langsam zu getropft. Die Reaktionsmischung wird 2 Std. bei 0°C gerührt, dann langsam auf RT erwärmt und 12 Std. bei RT gerührt. Im Anschluss wird die Reaktionslösung mit 10%-iger HCl-Lsg bis zu einem pH-Wert von 1.0 versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und nochmals mit NaOH-Lsg (2 N) gelöst und im Anschluss wiederum mit 10%-iger HCl-Lsg ausgefällt (pH 1). Nach nochmaliger Filtration wird der Niederschlag im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute beträgt 1.21 g (3.05 mmol) = 87%.

**Rf:** 0.11 (Dichlormethan / Methanol 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub> DMSO, DMSO = 2.50 ppm): δ = 12.39 (bs, 2 H, COOH), 7.38 - 7.30 (m, 5 H, -Cbz), 5.00 (s, 2 H, -Cbz), 3.55 (s, 1 H, H – 16), 3.48 (s, 1 H, H – 16), 3.46 (s, 1 H, H – 15), 3.40 (s, 1 H, H – 15), 3.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H – 2), 2.96 (q, *J* = 6.4 Hz, 2 H, H – 6), 1.65 – 1.47 (m, 2 H, H – 3), 1.44 – 1.21 (m, 4 H, H – 4, H – 5) ppm.

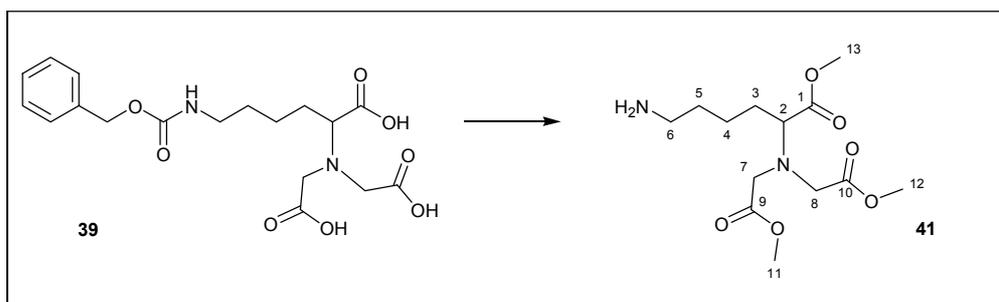
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $d_6$  DMSO, DMSO = 39.5 ppm):  $\delta$  = 173.9 ( $\text{C}_q$ , C – 1), 173.2 ( $\text{C}_q$ , C – 17, C – 18), 156.1 ( $\text{C}_q$ , -Cbz), 137.3 ( $\text{C}_q$ , -Cbz), 128.34 (CH, -Cbz), 127.7 ( $\text{C}_q$ , -Cbz), 65.1 ( $\text{CH}_2$ , -Cbz), 64.3 (CH, C – 2), 53.3 ( $\text{CH}_2$ , C – 15, C – 16), 40.1 ( $\text{CH}_2$ , C – 6), 29.3 ( $\text{CH}_2$ , C – 3), 29.2 ( $\text{CH}_2$ , C – 5), 23.0 ( $\text{CH}_2$ , C – 4) ppm.

**HRMS (ESI):** ( $\text{M-H}$ ) $^-$  berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8$ : 395.1911, gefunden: 395.1915.

Farblos amorpher Feststoff:  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ ; MG = 396.39 g/mol.

### 9.5.3 Veresterung und Entschützung des Lysinlinkers

6-Amino-2-(bis-methoxycarbonylmethyl-amino)-hexansäuremethylester (**41**)



Zu einer Lösung von 1.2 g (3.03 mmol) 6-Benzyloxycarbonylamino-2-(bis-carboxymethyl-amino)-hexansäure in 10 ml MeOH wird 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konz. gegeben und die Reaktionslösung über Nacht refluxiert. Im Anschluss wird sie mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung neutralisiert und mit Dichlormethan (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt. Hierzu werden unter Ausschluss von Sauerstoff 400 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre bei RT gerührt. Nach DC – Kontrolle wird die Reaktion beendet und die Reaktionslösung durch Filtration über Kieselgur vom Pd/C getrennt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Ausbeute beträgt 903 mg (2.967 mmol) = 98%.

**Rf:** 0.25 (Essigsäureethylester).

**IR (Golden Gate /ATR):** 2951, 1729, 1574, 1434, 1200, 1153, 988, 731  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $d_6$  DMSO, DMSO = 2.50 ppm):  $\delta$  = 3.71 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 2 H, H - 7), 3.68 (s, 6 H, H - 11, H - 12), 3.66 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 2 H, H - 8), 3.47 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1 H, H - 2), 2.93 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 2 H, H - 6), 1.65 – 1.47 (m, 2 H, H - 3), 1.44 – 1.21 (m, 4 H, H - 4, H - 5) ppm.

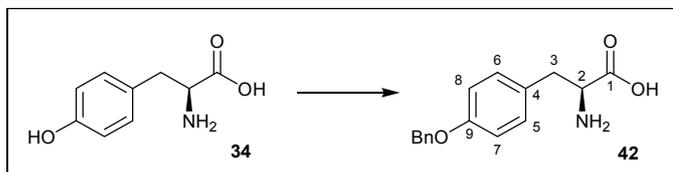
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $d_6$  DMSO, DMSO = 39.5 ppm):  $\delta$  = 174.4 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 173.7 ( $\text{C}_q$ , C - 11, C - 12), 65.4 (CH, C - 2), 53.5 ( $\text{CH}_2$ , C - 7, C - 8), 52.1 ( $\text{CH}_3$ , C - 11), 52.1 ( $\text{CH}_3$ , C - 12), 52.0 ( $\text{CH}_3$ , C - 13) 40.7 ( $\text{CH}_2$ , C - 6), 30.5 ( $\text{CH}_2$ , C - 3), 28.2 ( $\text{CH}_2$ , C - 5), 23.7 ( $\text{CH}_2$ , C - 4) ppm.

**HRMS (ESI):** ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$ : 305.1115, gefunden: 305.1110.

Gelbliches Öl,  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$ , MG = 304.33 g/mol.

### 9.5.4 Schützung von Tyrosin

#### 2-Amino-3-(4-benzyloxy-phenyl)-propansäure (**42**)



Zu einer Lösung von 10.0 g (55.2 mmol) L-Tyrosin in 100 mL NaOH-Lösung (0.5 N) wird eine Lösung von 15.5 g (55.2 mmol)  $\text{CuSO}_4$  in 50 mL Wasser gegeben. Die Reaktionsmischung wird 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss werden 100 mL Methanol und 10.3 g (82.8 mmol) Benzylchlorid hinzu gegeben. Es wird weitere 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird der Niederschlag abfiltriert und 3-mal mit 20 mL Wasser, 2-mal mit 20 mL Methanol und 2-mal mit 20 mL MTB-Ether gewaschen. Der Rückstand wird luftgetrocknet und das trockene Produkt mit verdünnter HCl-Lösung (2 N) suspendiert und 20 min bei 50°C gerührt. Im Anschluss wird der Niederschlag noch einmal filtriert und noch ein weiteres Mal mit verdünnter HCl-Lösung suspendiert. Die Suspension wird 10 min bei 50°C gerührt und filtriert. Der Filtrierückstand wird getrocknet. Die Ausbeute beträgt 9.502 g (35.7 mmol) = 64%.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub> DMSO = 2.50 ppm) : δ = 8.56 (bs, 1 H, -COOH), 7.44 (d, *J* = 7.0 Hz, 2 H, -OBn), 7.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H, -OBn), 7.32 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H, -OBn), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H – 5, H – 6), 6.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H – 7, H – 8), 5.07 (s, 2 H, -OBn), 4.06 (t, *J* = 6.0 Hz, H – 2), 3.11 (d, *J* = 6.0 Hz, 2 H, H – 3) ppm.

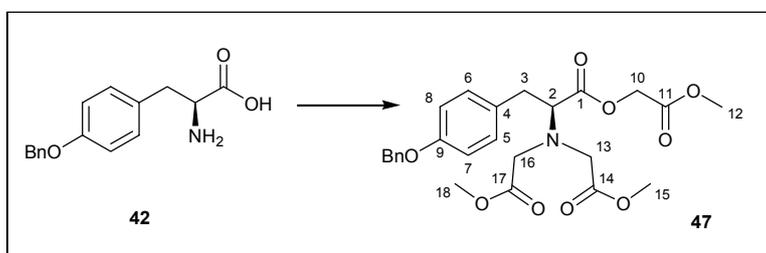
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, d<sub>6</sub> DMSO = 39.5 ppm): δ = 170.3 (C<sub>q</sub>, C – 1), 157.6 (C<sub>q</sub>, C – 9), 137.2 (C<sub>q</sub>, -OBn), 130.7 (CH, C – 5, C – 6), 128.5 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.0 (C<sub>q</sub>, C – 4), 114.8 (CH, C – 7, C – 8), 69.2 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 53.4 (CH, C – 2), 34.8 (CH<sub>2</sub>, C – 3) ppm

**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>: 270.1118, gefunden: 270.1130.

Farbloser, amorpher Feststoff, C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> MG = 271.12 g/mol.

### 9.5.5 Alkylierung von O-Benzyltyrosin

3-(4-Benzylloxy-phenyl)-2-(bis-methoxycarbonylmethyl-amino)-propansäure-methoxycarbonylmethylester (**47**)



Zu einer Lösung von 2.0 g (7.4 mmol) 2-L-Amino-3-(4-benzyloxy-phenyl)-propansäure (**42**) in 15 mL 3-Pentanon werden 8.5 g (55,5 mmol) Bromessigsäuremethylester, 5.5 g (55,5 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 20 mg (54 μmol) Tetrabutylammoniumiodid gegeben. Die Reaktion wird über Nacht bei 108°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird die Mischung mit so viel Wasser versetzt, bis das restliche Kaliumcarbonat gelöst ist. Das Produkt wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE=5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 1.9 g (4.1 mmol) = 55%.

**Rf:** 0.28 (PE / EE 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 7.42 – 7.30 (m, 5 H, -OBn), 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H – 5, H – 6), 6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H – 7, H – 8), 5.01 (s, 2 H, -OBn), 4.55 (dd, *J* = 32.6 und 15.8 Hz, 2 H, H – 10), 3.80 (dd, *J* = 8.7 und 6.3 Hz, 1 H, H – 2), 3.73 (s, 4 H, H – 13, H – 16), 3.70 (s, 3 H, H – 12), 3.67 (s, 6 H, H – 15, H – 18), 3.02 (dd, *J* = 13.6 und 11.8, 1 H, H – 3) ppm.

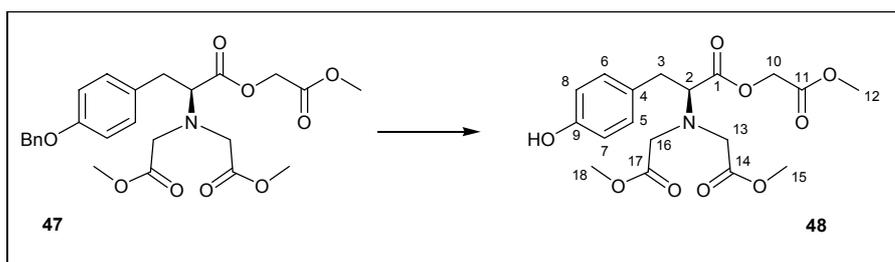
**<sup>13</sup>C-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 171.5 (Cq, C – 14, C – 17), 170.8 (Cq, C – 1), 167.9 (Cq, C – 9), 137.0 (Cq, -OBn), 130.2 (CH, C – 5, C – 6), 129.4 (Cq, C – 4), 128.4 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 114.6 (CH, C – 7, C – 8), 69.8 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 66.4 (CH, C – 2), 60.4 (CH<sub>2</sub>, C – 12), 52.5 (CH<sub>2</sub>, C – 13, C – 16), 52.0 (CH<sub>3</sub>, C – 12), 51.6 (CH<sub>3</sub>, C – 15, C – 18), 35.9 (CH<sub>2</sub>, C – 3) ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>9</sub>: 488.1921, gefunden: 488.1925.

Gelbliches Öl, C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>9</sub>, MG = 487.50 g/mol.

### 9.5.6 Debenzylierung des Tyrosin-Linkers

2-(Bis-methoxycarbonylmethyl-L-amino)-3-(4-hydroxy-phenyl)-propansäure-methoxycarbonylmethylester (**48**)



Zu einer Lösung von 1990 mg (4.082 mmol) 3-(4-Benzyloxy-phenyl)-2-(bis-methoxycarbonylmethyl-L-amino)-propansäure-methoxycarbonylmethylester in MeOH werden unter Ausschluss von Sauerstoff 600 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle wird die Reaktion beendet und die Reaktionslösung durch

Filtration über Kieselgur vom Pd/C getrennt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Ausbeute beträgt 1614 mg (4.062 mmol) = 99%.

**Rf:** 0.25 (PE / EE 3:2).

**IR (Golden Gate / ATR):** 2954, 1733, 1516, 1437, 1205, 1142, 1012, 829  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 7.18$  (d,  $J = 8.8$  Hz, 2 H, H – 5, H – 6), 6.86 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2 H, H – 7, H – 8), 4.64 (s, 2 H, H – 16), 4.63 (s, 2 H, H – 13), 3.82 (s, 3 H, H – 15), 3.78 (dd,  $J = 7.8$  und 1.3 Hz, 1 H, H – 2), 3.77 (s, 3 H, H – 18), 3.70 (s, 3 H, H – 12), 3.67 (s, 6 H, H – 15, H – 18), 3.56 (s, 1 H, H – 10), 3.35 (s, 1 H, H – 10), 3.08 (dd,  $J = 13.9$  und 6.0, 1 H, H – 3), 2.95 (dd,  $J = 13.9$  und 7.8, 1 H, H – 3) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$ ):  $\delta = 173.1$  (Cq, C – 17), 172.0 (Cq, C – 14), 169.3 (Cq, C – 1), 167.9 (Cq, C – 9), 156.7 (Cq, C – 9), 130.4 (CH, C – 5, C – 6), 129.9 (Cq, C – 4), 114.7 (CH, C – 7, C – 8), 65.4 ( $\text{CH}_2$ , C – 16), 61.8 (CH, C – 2), 60.7 ( $\text{CH}_2$ , C – 13), 52.4 ( $\text{CH}_3$ , C – 12), 52.4 ( $\text{CH}_3$ , C – 15), 52.4 ( $\text{CH}_3$ , C – 18), 48.7 ( $\text{CH}_2$ , C – 10), 38.3 ( $\text{CH}_2$ , C – 3) ppm.

**HRMS (ESI):**  $(\text{M}+\text{Na})^+$  berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_9\text{Na}$ : 420.1271, gefunden: 420.1271.

Gelbliches Öl,  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_9$ , MG = 397.38 g/mol.

## 9.6 Versuche zu Kapitel 3.2

### 9.6.1 Darstellung des Polymers vom Typ 3

Zu einer  $50^\circ\text{C}$  warmen Lösung von 1.302 g (10 mmol) Divinylbenzol in 35 mL Dodecan werden unter Rühren 10.683 g (70 mmol) Vinylbenzylchlorid und 2.223 g (20 mmol) Vinylpyrrolidinon gegeben. Die Reaktionsmischung wird mit 82 mg (5.0  $\mu\text{mol}$ ) AIBN versetzt und bei  $70^\circ\text{C}$  im Trockenschrank 5 Std. zur Reaktion gebracht. Zur Aufarbeitung wird der Rohansatz in einen Soxhletextraktor gegeben und 48 Std. mit Cyclohexan

extrahiert. Anschließend wird das Produkt im Vakuum getrocknet. Das Produkt ist ein farbloses Polymer. Die Ausbeute beträgt 8.798 g.

**IR (Golden Gate /ATR):** 2919, 2324, 1681, 1487, 1445, 1421, 1265, 833, 797, 708.

## 9.7 Versuche zu Kapitel 3.3

### 9.7.1 Beladung des Typ 3-Harzes mit dem Lysin-Linker 41

Zu einer Lösung von 184 mg (0.60 mmol) des Lysinlinkers (**41**) in 15 mL abs. NMP werden 73 mg (0.75 mmol) NaO<sup>t</sup>Bu und 200 mg (ca. 1 mmol Funktionalität) des A<sub>3</sub>P-Harzes gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei 60°C 72 Std. lang geschüttelt (75 rpm). Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung filtriert und das Harz mit H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan, MeOH, H<sub>2</sub>O, MeOH, Dichlormethan (je 10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung wird über den Massenzuwachs und über IR-Spektroskopie bestimmt. Die Ausbeute beträgt 245 mg. Die Beladung beträgt 45 mg, (0.15 mmol) = 15 %.

**IR (golden Gate / ATR):** 2921, 1733, 1661, 1445, 1224, 1154, 1021, 797, 704 cm<sup>-1</sup>.

### 9.7.2 Verseifung des Lysinlinkers 41 am Harz (Typ 3)

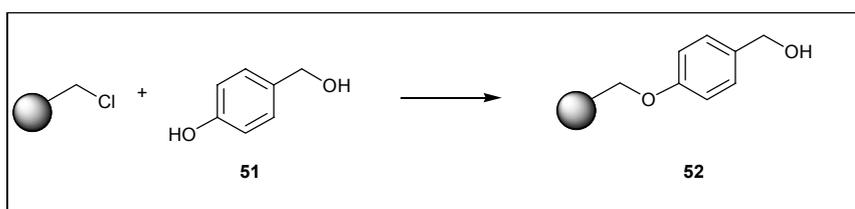
Das mit dem Linker beladene Harz wird mit 10 mL H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) und 10 Äq LiOH versetzt. Und nach **AAV2** verseift und aufgearbeitet. Die Ausbeute beträgt 233 mg.

**IR (Golden Gate /ATR):** 2918, 2359, 1729, 1667, 1607, 1443, 1269, 1153, 1017, 800, 707 cm<sup>-1</sup>.

### 9.7.3 Beladung des NTA-Harzes mit Ni<sup>2+</sup>

Alle Harze werden nach dem Verseifen nach **AAV3** mit Ni<sup>2+</sup> beladen. Die Beladung wird nur visuell durch die Verfärbung des Polymers von hellgelb nach hellblau verfolgt.

### 9.7.4 Darstellung des Wang-Harzes



200 mg (1 mmol Funktionalität) des Harzes vom Typ 3 werden in 5 mL DMF suspendiert. Unter Eiskühlung werden 372 mg (3.0 mmol) 4-Hydroxybenzylalkohol und anschließend 74 mg (3.1 mmol) mit Hexan gewaschenes NaH hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird 48 Std. bei 75°C geschüttelt. Zur Aufarbeitung wird das Harz gewaschen mit DMF, Dioxan, Dichlormethan, MeOH (je 10 mL) und im Anschluss im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute beträgt 283 mg. Die Beladung beträgt 83 mg, (0.95 mmol) = 95%.

**IR (Golden Gate /ATR):** 2917, 1643, 1609, 1510, 1444, 1219, 1172, 1016, 821 cm<sup>-1</sup>.

## 9.8 Versuche zu Kapitel 3.4

### 9.8.1 Beladung der Harze mit dem Thyrosin-Linker 48

200 mg des jeweiligen Harzes werden nach **AAV1** mit 227 mg (0.600 mmol) des Thyrosin-Linkers (**48**) in 15 mL DMF beladen und aufgearbeitet. Die Massenzuwächse betragen:

Harz	Massenzuwachs/Beladung
Typ 1	49 mg / 13 %
Typ 2	79 mg / 22 %
Typ 3	110 mg / 30 %
Typ 4	40 mg / 11 %
Typ 5	44 mg / 12 %

**IR (Golden Gate /ATR):** 2919, 2324, 1741, 1680, 1512, 1441, 1266, 1215, 1155, 1017, 796, 709  $\text{cm}^{-1}$ .

Die IR – Daten der einzelnen Polymerproben stimmen miteinander überein.

### 9.8.2 Verseifung des Tyrosin-Linkers 48 an den Harzen

Die mit dem Linker beladenen Harze werden nach **AAV2** verseift und aufgearbeitet. Die Massen betragen:

Harz	Masse des Harzes
Typ 1	213 mg
Typ 2	230 mg
Typ 3	275 mg
Typ 4	220 mg
Typ 5	210 mg

**IR (Golden Gate / ATR):** 2918, 2324, 1731, 1679,1608,1511, 1442, 1220, 1176, 1016, 797, 707  $\text{cm}^{-1}$ .

## 9.9 Versuche zu Kapitel 3.5

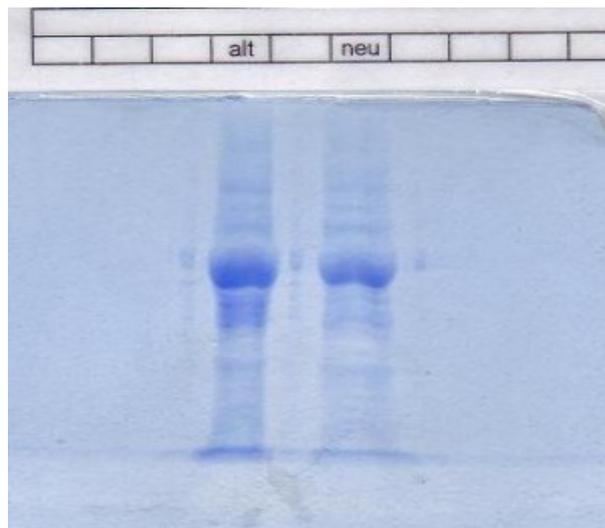
### 9.9.1 Expression von BAL in *E. coli*

#### 1. „Über-Nacht-Kultur“

In vier sterile Reagenzgläser werden jeweils 5 mL steriles LB Medium gegeben. Das Medium wird mit 5  $\mu$ L Neomycin (50 mg/mL) und 5  $\mu$ L Carbenicillin (100 mg/mL) versetzt. Mit einem sterilen Zahnstocher wird etwas aus dem Glycerinstock entnommen und in je eines der Reagenzgläser gegeben. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C und 60 rpm geschüttelt.

#### 2. Expression von BAL

In fünf sterile Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen werden 3 g LB-Medium gegeben und mit  $H_2O_{\text{bidest}}$  auf 150 mL aufgefüllt. Im Anschluss werden 150  $\mu$ L Neomycinlösung (50 mg/mL) und 150  $\mu$ L Ampicillinlösung (100 mg/mL) zugesetzt. Diese Lösungen werden mit je 1500  $\mu$ L einer „Über-Nacht-Kultur“ beimpft. Es wird 2-3 Std. bei 37°C und 60 rpm geschüttelt, bis die OD 0.6 bis 0.9 bei 590 nm beträgt. Dann werden 150  $\mu$ L IPTG-Lösung (1M) zugesetzt. Nach weiteren 20-24 Std. (Schütteln bei 37°C und 60 rpm) werden die Zellen durch Zentrifugation (20 min bei 10000 rpm) geerntet. Die Zellen werden in Phosphatpuffer (50 mM) pH 7.0 aufgenommen und mittels Ultraschall (4 x 30 s. bei 30 Watt) aufgeschlossen. Das Enzym wird mittels des beladenen A<sub>3</sub>P-Harzes gereinigt und die Expression über eine SDS-Page überprüft.



**Abbildung 58:** SDS - Page der Zellyse von *E. coli* BL21 nach der Expression von BAL – Vergleich mit vorhandener Probe.

## 9.10 Versuche zu Kapitel 3.6

### 9.10.1 Beladung der verschiedenen Tyrosinharze Typ 1-Typ 5 mit BAL

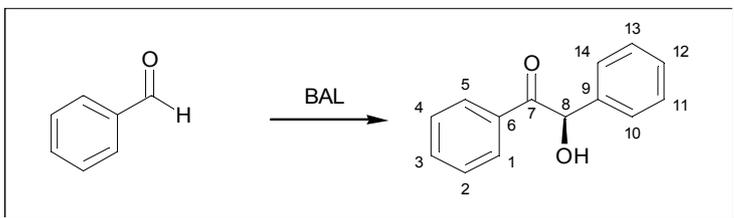
200 mg des jeweiligen mit dem Tyrosin-Linker beladenen Harzes werden nach **AAV9** mit 250  $\mu$ L, Zellyse von *E. coli* BL21 beladen um die His<sub>6</sub>-tag tragende Benzaldehydlyase zu immobilisieren. Die Beladungen der Harze waren wie folgt.

Menge des Zellysates	Beladungen mit BAL
Polymer 1	556 $\mu$ g
Polymer 2	526 $\mu$ g
Polymer 3	1075 $\mu$ g
Polymer 4	572 $\mu$ g
Polymer 5	500 $\mu$ g

Die Reinheit der immobilisierten Enzymmengen wurde nach **AAV13** mittels denaturierender Gelelektrophorese bestimmt. Die Abbildungen der Gele befinden sich in Kapitel 3.6.

## 9.11 Versuche zu Kapitel 3.7

### 9.11.1 Überprüfung der Reaktionsfähigkeit der Enzyme am Harz-Aktivitätstest



20  $\mu\text{L}$  des Zelllysates werden in 4 mL des Reaktionspuffers gegeben und mit 30  $\mu\text{L}$  (29 mg, 0.27 mmol) Benzaldehyd versetzt. Die Reaktionsmischung wird 3 Std. bei 30°C geschüttelt. Die Reaktionsmischung wird mit Essigsäureethylester (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Ausbeute beträgt 29 mg (13 mmol) = 99%.

**Rf:** 0.35 (Dichlormethan).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -141.2$  ( $c = 0.99$ , Aceton), Der Drehwert stimmt mit der Literatur überein<sup>173</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, DMSO, DMSO = 2.50 ppm):  $\delta = 8.00$  (bs, 1 H, H – 1), 7.98 (bs, 1 H, H - 6), 7.52 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 3), 7.42 – 7.39 (m, 4 H, H – 2, H – 4, H – 10, H – 14), 7.29 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 11), 7.27 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 13), 7.19 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 12), 6.09 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1 H, -OH), 6.05 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1 H, H – 8) ppm.

<sup>173</sup> D.Enders, U. Kallfass, *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 1822 – 1824.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO = 39.5 ppm):  $\delta$  = 199.2 (C<sub>q</sub>, C – 7), 139.8 (C<sub>q</sub>, C – 6), 134.8 (C<sub>q</sub>, C – 9), 133.2 (CH, C – 3), 128.9 (CH, C – 10, C – 14), 128.6 (CH, C – 11, C – 13), 128.5 (CH, C – 1, C – 5), 127.7 (CH, C – 12), 127.3 (CH, C – 2, C – 4), 75.7 (CH, C – 8) ppm.

**HRMS (ESI):** (M+ Na)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>Na: 235.0784, gefunden: 235.0779.

Gelblicher kristalliner Feststoff, C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub> MG = 212.2 g/mol, Schmelzpunkt: 132.5°C  
Literaturwert: 132.0°C<sup>174</sup>.

### 9.11.2 Umsetzung von Benzaldehyd mit BAL – Vergleich der Harze vom Typ 1-5

100 mg des jeweiligen Tyrosinharzes (Typ 1-Typ 5) werden mit 250µL Zellyse beladen (**AAV9-2**) und gewaschen. Im Anschluss wird das Harz 4 x mit dem Reaktionspuffer 1 gewaschen und dann mit 5 mL Reaktionspuffer 1 versetzt. Es werden zwischen 15 µL Benzaldehyd zugefügt. Die Reaktionsmischungen werden bei 30°C und 80 rpm geschüttelt. Bei 0, 30 und 60 min. werden Proben zu 200 µl entnommen und mit 200 µL Essigsäureethylester extrahiert und der Reaktionsverlauf, bzw. die Abnahme von Benzaldehyd in den Lösungen, per geeichter GC verfolgt. Hierzu wurde der Gaschromatograph mittels Benzaldehydlösungen verschiedener Konzentrationen geeicht. Zur Aufarbeitung werden die Reaktionsansätze mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die spektroskopischen Daten des Produkts stimmen mit denen aus dem Aktivitätstest überein.

---

<sup>174</sup> D. P. Macaione, S. E. Wentworth, *Synthesis*, **1974**, 716.

Harz	Benzaldehyd- konzentration bei 0 min [mg/mL]	Benzaldehyd- konzentration bei 30 min [mg/mL]	Benzaldehyd- konzentration bei 60 min [mg/mL]
1	0.001	0.042	0.029
2	0.001	0.040	0.037
3	0.038	0.049	0.001
4	0.016	0.040	0.007
5	0.040	0.042	0.017

## 9.12 Versuche zu Kapitel 3.8

### 9.12.1 Maximale Beladung des Lysinharzes mit BAL

200 mg des mit dem Lysin-Linker beladenen A<sub>3</sub>P-Harzes werden nach **AAV9** mit 100 µL, 200 µL, 500 µL und mit 750 µL Zellyse von *E. coli BL21* beladen um die His<sub>6</sub>-tag tragende Benzaldehydlyase zu immobilisieren. Die Beladungen der Harze waren wie folgt.

Menge des Zellysates	Beladungen mit BAL
100 µL	334 µg
250 µL	500 µg
500 µL	765 µg
750 µL	875 µg

Die Reinheiten der immobilisierten Enzymmengen wurden nach **AAV13** mittels denaturierender Gelelektrophorese bestimmt und entsprechen sind in Abbildung 32 abgebildet (Kapitel 3.8).

### 9.12.2 Maximale Beladung des Tyrosinharzes mit BAL

200 mg des mit dem Tyrosin-Linker beladenen A<sub>3</sub>P-Harzes werden nach **AAV9** mit 100 µL, 200 µL, 500 µL, und 750µL Zellyse von *E. coli BL21* beladen um die His<sub>6</sub>-tag tragende Benzaldehydlyase zu immobilisieren. Die Beladungen der Harze waren wie folgt.

Menge des Zellysates	Beladungen mit BAL
100 µL	387 µg
250 µL	605 µg
500 µL	1080 µg
750 µL	1711 µg

Die Reinheiten der immobilisierten Enzymmengen wurden nach **AAV13** mittels denaturierender Gelelektrophorese bestimmt und entsprechen der auf Abbildung 26 (Kapitel 3.6).

Zur Optimierung der Reinheit werden die Versuche nach **AAV9-2** wiederholt. Die Beladung der Harze war wie folgt.

Menge des Zellysates	Beladungen mit BAL
100 µL	333 µg
250 µL	520 µg
500 µL	975 µg
750 µL	1365 µg

Die Reinheiten der immobilisierten Enzymmengen wurden nach **AAV13** mittels denaturierender Gelelektrophorese bestimmt und entsprechen der auf Abbildung 27 (Kapitel 3.6).

### 9.13 Versuche zu Kapitel 3.9

#### 9.13.1 Reaktionskinetiken (loses Lysinharz)

100 mg des Lysinharzes werden mit 250  $\mu\text{L}$  Zelllyse beladen (**AAV9**) und gewaschen. Im Anschluss wird das Harz 4 x mit dem Reaktionspuffer 1 gewaschen und dann mit 5 mL Reaktionspuffer 1 versetzt. Es werden zwischen 15  $\mu\text{L}$  und 200  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd zugefügt. Die Reaktionsmischungen werden bei 30°C und 80 rpm geschüttelt. Alle 30 min. werden Proben zu 200  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 200  $\mu\text{L}$  Essigsäureethylester extrahiert und der Reaktionsverlauf per GC verfolgt. Zur Aufarbeitung werden die Reaktionsansätze mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die spektroskopischen Daten des Produkts stimmen mit denen aus dem Aktivitätstest überein.

Menge Benzaldehyd	Reaktionszeit	Ausbeute Benzoin
15 $\mu\text{L}$ (16 mg, 0.15 mmol)	95 min	15 mg, 7 mmol, 93.0%
30 $\mu\text{L}$ (29 mg, 0.27 mmol)	158 min	29 mg, 13 mmol, 99.9%
100 $\mu\text{L}$ (104 mg, 0.98 mmol)	245 min	102 mg, 48 mmol, 98.0%
200 $\mu\text{L}$ (209 mg, 1.97 mmol)	405 min	205 mg, 0.97 mmol, 98.0%

#### 9.13.2 Reaktionskinetiken (loses Tyrosinharz)

100 mg des Tyrosinharzes werden mit 250 $\mu\text{L}$  Zelllyse beladen (**AAV9-2**) und gewaschen. Im Anschluss wird das Harz 4 x mit dem Reaktionspuffer 1 gewaschen und dann mit 5 mL Reaktionspuffer 1 versetzt. Es werden zwischen 15  $\mu\text{L}$  und 500  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd zugefügt. Die Reaktionsmischungen werden bei 30°C und 80 rpm geschüttelt. Alle 30 Min. werden Proben zu 200  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 200  $\mu\text{L}$  Essigsäureethylester extrahiert und der Reaktionsverlauf per GC verfolgt (siehe loses Lysinharz). Zur Aufarbeitung werden die Reaktionsansätze mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die spektroskopischen Daten des Produkts stimmen mit denen aus dem Aktivitätstest überein.

Menge Benzaldehyd	Reaktionszeit	Ausbeute Benzoin
15 µL (16 mg, 0.15 mmol)	85 min	14 mg, 7 mmol, 93.0%
30 µL (29 mg, 0.27 mmol)	90 min	29 mg, 13 mmol, 99.9%
100 µL (104 mg, 0.98 mmol)	90 min	98 mg, 46 mmol, 94.0%
200 µL (209 mg, 1.97 mmol)	150 min	200 mg, 0.94 mmol, 96.0%
500µL (522 mg, 4.92 mmol)	540 min	386 mg, 1.82 mmol, 74.0 %

### 9.13.3 Umsetzung von Benzaldehyd am Tyrosinharz ohne Regeneration des Polymers mit Enzym

Je 30 µL Benzaldehyd werden in 4 mL Reaktionspuffer 2 mit 100 mg des mit BAL beladenen (**AAV9-2**) Polymeres 3 versetzt und bei 37°C und 60 rpm geschüttelt. Alle 30 Minuten werden 100 µL entnommen und mit 100 µL Essigsäureethylester extrahiert. Aus der organischen Phase werden 5 µL große Proben für die Gaschromatographie entnommen und so der Konzentrationsverlauf des Benzaldehyds während der Reaktion verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung des Benzaldehyds wird das Polymer mit 15 mL Essigsäureethylester gewaschen und der Reaktionspuffer mit Essigsäureethylester extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Polymer wird in 4 mL Reaktionspuffer regeneriert und nach dem Filtrieren erneut – ohne zusätzliche Beladung mit Enzym - in die Reaktion eingesetzt. Die Produkte werden nicht weiter aufgereinigt. Alle spektroskopischen Daten der Produkte stimmen mit denen aus dem Aktivitätstest überein. Die Ausbeuten betragen: 1. Lauf 29 mg (13 mmol) = 99,9%, 2. Lauf 29 mg (13 mmol) = 99,9%, 3. Lauf 25 mg (11mmol) = 86.1 %, 4. Lauf 29 mg, (13 mmol) = 99,9%.

## 9.14 Versuche zu Kapitel 3.10

### 9.14.1 Beladung der Passflow-Säule mit dem Lysin-Linker 41

Die Passflow-Säule wird wie in **AAV4** beschrieben mit 184 mg (0.60 mmol) Lysinlinker **41**, in 15 mL abs. DMF beladen und aufgearbeitet. Im Anschluss wird der Linker mit 99 mg LiOH in 20 mL H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) nach **AAV5** verseift. Nach erfolgter Aufarbeitung wird die Säule nach **AAV6** siliconisiert und im Anschluss mit Nickel (**AAV7**) beladen.

### 9.14.2 Beladung der Passflow-Säule mit dem Tyrosin-Linker 48

Die Passflow-Säule wird wie in **AAV4** beschrieben mit 227 mg (0.600 mmol) Tyrosin-Linker **48**, in 15 mL abs. DMF beladen und aufgearbeitet. Im Anschluss wird der Linker mit 99 mg LiOH in 20 mL H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) nach **AAV5** verseift. Nach erfolgter Aufarbeitung wird die Säule nach **AAV6** siliconisiert und im Anschluss mit Nickel (**AAV7**) beladen.

### 9.14.3 Maximale Beladung der Lysin-PASSflow-Säule mit BAL

200 mg des mit dem Lysin-Linker beladenen Typ 3-Harzes werden nach **AAV9** mit 100 µL, 200 µL, 500 µL und mit 750 µL Zellyse von *E. coli* BL21 beladen um die His<sub>6</sub>-tag tragende Benzaldehydlyase zu immobilisieren. Die Beladungen der Harze waren wie folgt.

Menge des Zelllysates	Beladungen mit BAL
100 µL	311 µg
250 µL	407 µg
500 µL	750 µg
750 µL	865 µg

Die Reinheiten der immobilisierten Enzymmengen wurden nach **AAV13** mittels denaturierender Gelelektrophorese bestimmt und sind in Abbildung 40 (Kapitel 3.10.1) abgebildet.

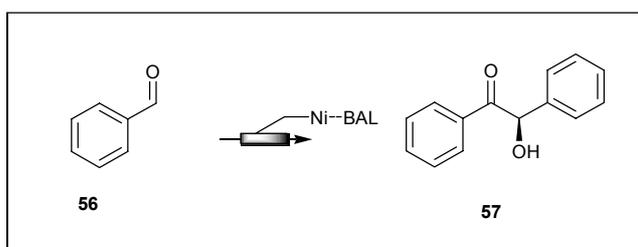
#### 9.14.4 Maximale Beladung der Tyrosin-PASSflow-Säule mit BAL

200 mg des mit dem Tyrosin-Linker beladenen A<sub>3</sub>P-Harzes werden nach **AAV9** mit 100 µL, 200 µL, 500 µL und mit 750 µL Zellyse von *E. coli* BL21 beladen um die His<sub>6</sub>-tag tragende Benzaldehydlyase zu immobilisieren. Die Beladungen der Harze waren wie folgt.

Menge des Zellysates	Beladungen mit BAL
100 µL	436 µg
250 µL	570 µg
500 µL	1100 µg
750 µL	2281 µg

Die Reinheiten der immobilisierten Enzymmengen wurde nach **AAV13** mittels denaturierender Gelelektrophorese bestimmt und sind in Abbildung 41 (Kapitel 3.10.1) abgebildet.

#### 9.14.5 Umsetzung von Benzaldehyd 56 mit BAL in der Passflow-Säule (Lysin-Linker)



Die *Passflow*-Säule wird mit 500 µL Zellyse beladen (**AAV11**) und mit 5 mL Reaktionspuffer 1 gewaschen. Es werden 30 µL Benzaldehyd in 5 mL Reaktionspuffer 1 gegeben und bei 0.5 ml/min durch die *Passflow*-Säule gepumpt (single pass). Nach dem ersten Durchpumpen war der Benzaldehyd vollständig zu Benzoin umgesetzt. Die Säule wurde im Anschluss mit 10 mL Aceton gespült. Die gespülten Fraktionen wurden vereinigt und das Aceton im Vakuum entfernt. Im Anschluss wurde die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Ausbeute beträgt 29 mg (13 mmol) = 99.9%.

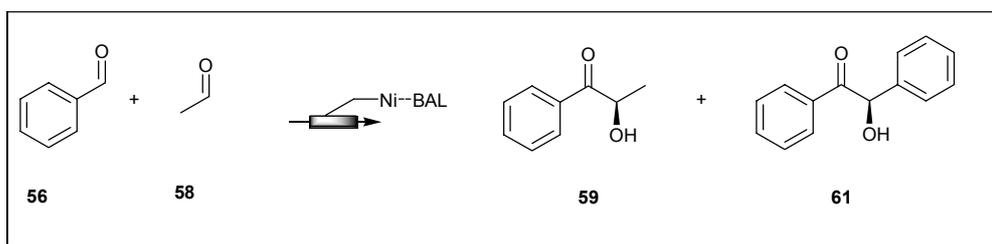
Die Spektroskopischen Daten des Produkts stimmen mit denen aus dem Aktivitätstest überein.

#### **9.14.6 Umsetzung von Benzaldehyd mit BAL in der *Passflow*-Säule (Tyrosin-Linker)**

Die *Passflow*-Säule wird mit 500 µL Zellyse beladen (**AAV11**) und mit 5 mL Reaktionspuffer 1 gewaschen. Es werden 30 µL Benzaldehyd in 5 mL Reaktionspuffer 1 gegeben und bei 0.5 ml/min durch die *Passflow*-Säule gepumpt (single pass). Nach dem ersten Durchpumpen war der Benzaldehyd vollständig zu Benzoin umgesetzt. Die Säule wurde im Anschluss mit 10 mL Aceton gespült. Die gespülten Fraktionen wurden vereinigt und das Aceton im Vakuum entfernt. Im Anschluss wurde die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Ausbeute beträgt 29 mg (13 mmol) = 99.9%.

Die Spektroskopischen Daten des Produkts stimmen mit denen aus dem Aktivitätstest überein.

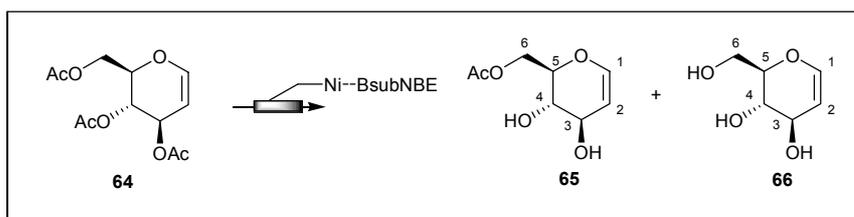
## 9.14.7 Gekreuzte Acyloinkupplung im PASSflow-Reaktor



30  $\mu\text{L}$  Benzaldehyd und 85  $\mu\text{L}$  Acetaldehyd werden in 6 mL Reaktionspuffer 2 mit 1.0 ml/min durch die nach **AAV11-2** mit BAL beladenen PASSflow-Säulen gepumpt. Sowohl der Vorlagekolben, als auch der Reaktor werden auf 37°C geheizt. Die Reaktionsmischung wird single pass durch den Reaktor gepumpt und dieser anschließend mit 10 mL Essigsäureethylester gewaschen und der Reaktionspuffer mit Essigsäureethylester extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Produkte werden mittels Säulenchromatographie (PE/E = 5:1) gereinigt. Alle spektroskopischen Daten der Produkte stimmen mit denen aus dem Aktivitätstest bzw. mit den Daten aus der Dissertation von E. Janzen und der Literatur<sup>175</sup> überein. Die Ausbeuten betragen: Kreuzkupplungsprodukt (farbloses Öl), 42 mg (28 mmol) = 92%, Benzoin 4 mg (2 mmol) = 8%.

## 9.15 Versuche zu Kapitel 3.12

## 9.15.1 Umsetzung von Tri-O-acetyl-D-glucal mit BsubNBE



175 M. Pohl, B. Lingen, M. Müller, *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 5288 – 5295.

Die PASSflow-Säule wird mit 5 mg des reinen Enzyms BsubNBE nach **AAV12** beladen. Es werden 100 mL Reaktionspuffer 2 mit 100 mg (0.38 mmol) Tri-O-acetyl-D-glucal versetzt und 60 Std. bei 37°C im Kreislauf bei 0.5 mL/min durch die Säule gepumpt. Im Anschluss wird die Säule mit 20 mL MTB-Ether gespült. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die Reaktionsmischung gefriergetrocknet. Der farblose Feststoff wird in Essigsäureethylester aufgenommen und die Produkte werden mittels Säulenchromatographie (EE) gereinigt. Die Ausbeuten betragen 57 mg (0.30 mmol) = 80 % für Verbindung **65** und 7 mg (0.05 mmol) = 12 % für Verbindung **66**

Verbindung 65:

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 Mhz, d<sub>6</sub> Aceton, Aceton = 2.05 ppm):  $\delta$  = 6.31 (dd,  $J$  = 6.0 und 1.5 Hz, 1 H, H – 1), 4.72 (dd,  $J$  = 6.0 und 2.2 Hz, 1 H, H – 2), 4.58 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1 H, -OH), 4.43 (dd,  $J$  = 12.0 und 2.4 Hz, 1 H, H – 6), 4.32 (dd,  $J$  = 12.0 und 5.8 Hz, 1 H, H – 6), 4.16 (dt,  $J$  = 7.1 und 2.2 Hz, 1 H, H – 3), 3.93 (ddd,  $J$  = 10.2, 5.8 und 2.4 Hz, 1 H, H – 5), 3.62 (dd,  $J$  = 10.2 und 7.1 Hz, 1 H, H – 4), 2.94 (s, 1 H, -OH), 2.08 (s, 3 H, -OAc) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (200 MHz, d<sub>6</sub> Aceton, Aceton = 29.8 ppm):  $\delta$  = 171.0 (C<sub>q</sub>, -OAc), 143.7 (CH, C – 1), 105.2 (CH, C – 2), 77.2 (CH, C – 4), 70.6 (CH, C – 5), 69.9 (CH, C – 3), 63.8 (CH<sub>2</sub>, C – 6), 20.6 (CH<sub>3</sub>, -OAc) ppm.

Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>176</sup>

Verbindung 66:

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm):  $\delta$  = 6.34 (dd,  $J$  = 6.0 und 1.9 Hz, 1 H, H – 1), 4.68 (dd,  $J$  = 6.0 und 2.4 Hz, 1 H, H – 2), 4.16 (dt,  $J$  = 7.0 und 2.4 Hz, 1 H, H – 3), 4.43 (dd,  $J$  = 12.0 und 2.4 Hz, 1 H, H – 6), 4.32 (dd,  $J$  = 12.0 und 5.3 Hz, 1 H, H – 6), 3.93 (ddd,  $J$  = 9.7, 5.3 und 2.4 Hz, 1 H, H – 5), 3.62 (dd,  $J$  = 9.7 und 7.0 Hz, 1 H, H – 4) ppm.

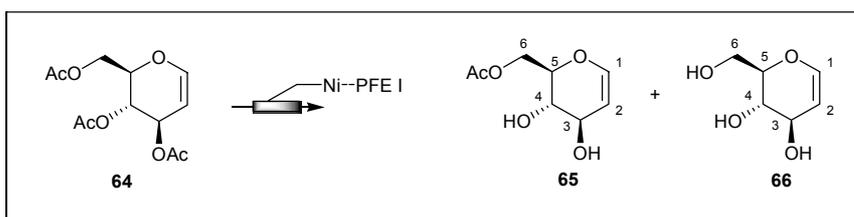
**<sup>13</sup>C-NMR** (200 MHz, Aceton = 29.8 ppm):  $\delta$  = 144.9 (CH, C – 1), 104.5 (CH, C – 2), 80.3 (CH, C – 4), 70.9 (CH, C – 5), 70.5 (CH, C – 3), 62.6 (CH<sub>2</sub>, C – 6) ppm.

Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>177</sup>

---

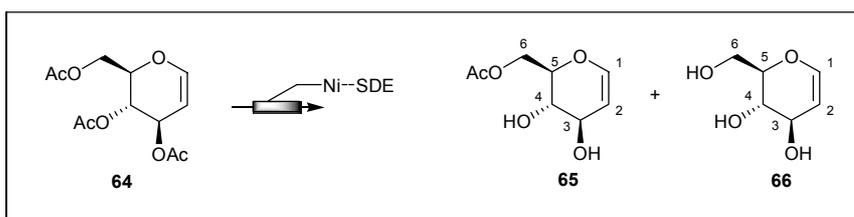
<sup>176</sup> G. C. Look, Y. Ichikawa, G.-J. Shen, P.-W. Cheng, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **1993**, *16*, 4326 - 4330.

<sup>177</sup> V. D. Bussolo, M. Caselli, M. Pineschi, P. Crotti, *Org. Lett.*, **2003**, *12*, 2173 – 2176.

9.15.2 Umsetzung von Tri-*O*-acetyl-D-glucal mit PFE I

Die *PASSflow*-Säule wird mit 5 mg des reinen Enzyms PFEI nach **AAV12** beladen. Es werden 100 mL Reaktionspuffer 2 mit 100 mg (0.38 mmol) Tri-*O*-acetyl-D-glucal versetzt und 60 Std. bei 37°C im Kreislauf bei 0.5 mL/min durch die Säule gepumpt. Im Anschluss wird die Säule mit 20 mL MTB-Ether gespült. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die Reaktionsmischung gefriergetrocknet. Der farblose Feststoff wird in Essigsäureethylester aufgenommen und die Produkte werden mittels Säulenchromatographie (EE) gereinigt. Die Ausbeuten betragen 54 mg (0.29 mmol) = 76 % für Verbindung **65** und 13 mg (0.10 mmol) = 23 % für Verbindung **66**.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten von Kapitel 9.14.1 überein.

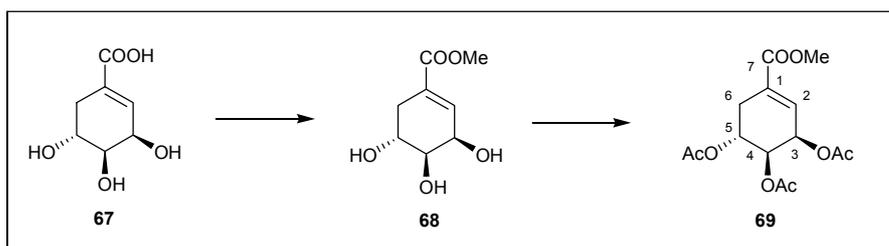
9.15.3 Umsetzung von Tri-*O*-acetyl-D-glucal mit SDE

Die *PASSflow*-Säule wird mit 5 mg des reinen Enzyms PFEI nach **AAV12** beladen. Es werden 100 mL Reaktionspuffer 2 mit 100 mg (0.38 mmol) Tri-*O*-acetyl-D-glucal versetzt und 60 Std. bei 37°C im Kreislauf bei 0.5 mL/min durch die Säule gepumpt. Im Anschluss wird die Säule mit 20 mL MTB-Ether gespült. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die Reaktionsmischung gefriergetrocknet. Der farblose Feststoff wird in Essigsäureethylester aufgenommen und die Produkte werden mittels

Säulenchromatographie (EE) gereinigt. Die Ausbeuten betragen 46 mg (0.24 mmol) = 64 % für Verbindung **65** und 19 mg (0.14 mmol) = 33 % für Verbindung **66**.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten von Kapitel 9.14.1 überein.

#### 9.15.4 Darstellung von Tri-*O*-acetyl-shikimisäuremethylester **69**



Zu einer Lösung von 200 mg (1.15 mmol) Shikimisäure in 10 mL MeOH werden 23 mg (0.12 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure gegeben und refluxiert. Nach 6 Std. werden weitere 23 mg (0.12 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure hinzu gegeben. Die Reaktion wird nach weiteren 3 Std. mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufarbeitung mit Pyridin (7 mL) und 3 mL Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert und eingengt. Im Anschluss wird das Rohprodukt noch 3x mit Toluol einrotiert um Pyridinreste zu entfernen. Das Rohprodukt wird in Dichlormethan aufgenommen und 2x mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 268 mg (0.85 mmol) = 74% über zwei Stufen.

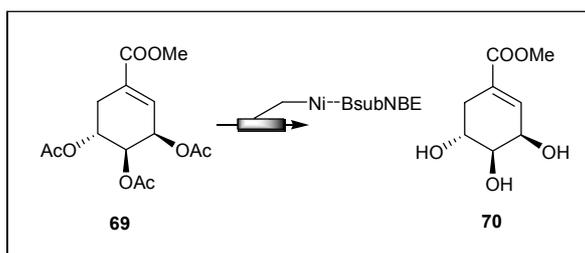
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 6.76 – 6.74 (m, 1 H, H – 2), 5.74 – 5.71 (m, 1 H, H – 4), 5.30 – 5.23 (m, 2 H, H – 3, H – 5), 3.70 (s, 3 H, -COOMe), 2.94 – 2.88 (m, 1 H, H – 6), 2.45 – 2.39 (m, 1 H, H – 6), 2.07 (s, 3 H, -OAc), 2.06 (s, 3 H, -OAc), 2.04 (s, 3 H, -OAc) ppm.

Alle zum Shikimisäuregerüst gehörenden Protonensignale zeigen Rotamere im NMR Spektrum.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 170.0$  ( $\text{C}_q$ , -OAc), 169.9 ( $\text{C}_q$ , -OAc), 169.8 ( $\text{C}_q$ , -OAc), 165.9 ( $\text{C}_q$ , -COOMe), 132.7 (CH, C - 2), 131.2 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 67.6 (CH, C - 4), 66.7 (CH, C - 5), 66.0 (CH, C - 3), 52.2 ( $\text{CH}_3$ , -COOMe), 28.5 ( $\text{CH}_2$ , C - 6), 20.9 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 20.7 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 20.6 ( $\text{CH}_3$ , -OAc) ppm.

Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>178</sup>

#### 9.15.4 Umsetzung von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester mit BsubNBE



Die PASSflow-Säule wird mit 5 mg des reinen Enzyms BsubNBE nach **AAV12** beladen. Es werden 100 mL Reaktionspuffer 2 mit 70 mg (0.22 mmol) Tri-O-acetylshikimisäuremethylester **69** versetzt und 60 Std. bei 37°C im Kreislauf bei 0.5 mL/min durch die Säule gepumpt. Im Anschluss wird die Säule mit 20 mL MTB-Ether gespült. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die Reaktionsmischung gefriergetrocknet. Der farblose Feststoff wird in Essigsäureethylester aufgenommen und die Produkte werden mittels Säulenchromatographie (EE) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 35 mg (0.18 mmol) = 85 %.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $d_6$ Aceton, Aceton = 2.05 ppm):  $\delta = 6.74 - 6.73$  (m, 1 H, H - 2), 4.02 (bs, 1 H, H - 4), 3.89 - 3.87 (m, 1 H, H - 5), 3.72 - 3.71 (m, 1 H, H - 3), 3.76 (s, 3 H, -COOMe), 2.67 - 2.61 (m, 1 H, H - 6), 2.22 - 2.17 (m, 1 H, H - 6), ppm.

Alle zum Shikimisäuregerüst gehörenden Protonensignale zeigen Rotamere im NMR Spektrum.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $d_6$ Aceton, Aceton = 29.8 ppm):  $\delta = 167.6$  ( $\text{C}_q$ , -COOMe), 138.9 (CH, C - 2), 129.6 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 72.2 (CH, C - 4), 67.8 (CH, C - 5), 67.0 (CH, C - 3), 51.9 ( $\text{CH}_3$ , -COOMe), 31.2 ( $\text{CH}_2$ , C - 6) ppm.

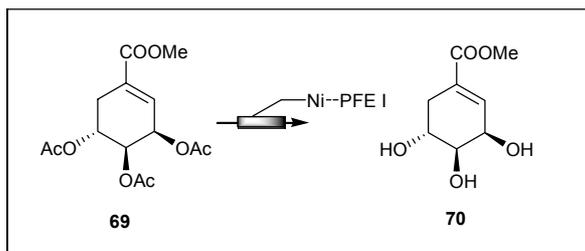
Die Spektren stimmen mit der Literatur überein.<sup>179</sup>

<sup>178</sup> A. Bionco, M. Burfan, F. Manna, C. Michinioni, *Carbohydr. Res.*, **2001**, *334*, 23 - 32.

**HRMS (ESI):** (M Na)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>Na: 211.0182 gefunden: 211.0178.

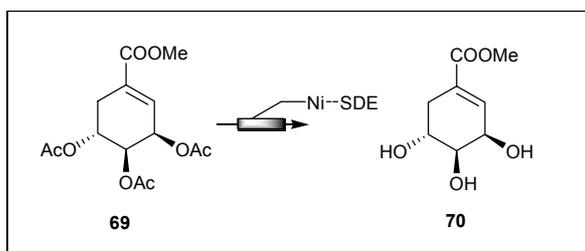
Farbloses Öl C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, MG = 211.06 g/mol.

### 9.15.5 Umsetzung von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester mit PFEI



Die *Passflow*-Säule wird mit 5 mg des reinen Enzyms BsubNBE nach **AAV12** beladen. Es werden 100 mL Reaktionspuffer 2 mit 70 mg (0.22 mmol) Tri-O-acetylshikimisäuremethylester **69** versetzt und 60 Std. bei 37°C im Kreislauf bei 0.5 mL/min durch die Säule gepumpt. Im Anschluss wird die Säule mit 20 mL MTB-Ether gespült. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die Reaktionsmischung gefriergetrocknet. Der farblose Feststoff wird in Essigsäureethylester aufgenommen und die Produkte werden mittels Säulenchromatographie (EE) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 33 mg (0.17 mmol) = 80 % Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Daten von Kapitel 9.14.4 überein.

### 9.15.6 Umsetzung von Tri-O-acetyl-shikimisäuremethylester mit SDE



<sup>179</sup> N. Armesto, M. Ferrero, S. Fernandez, V. Gotor, *J. Org. Chem.*, **2002**, *14*, 4978 – 4981.

Die PASSflow-Säule wird mit 5 mg des reinen Enzyms BsubNBE nach **AAV12** beladen. Es werden 100 mL Reaktionspuffer 2 mit 70 mg (0.22 mmol) Tri-O-acetylshikimisäuremethylester **69** versetzt und 60 Std. bei 37°C im Kreislauf bei 0.5 mL/min durch die Säule gepumpt. Im Anschluss wird die Säule mit 20 mL MTB-Ether gespült. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die Reaktionsmischung gefriergetrocknet. Der farblose Feststoff wird in Essigsäureethylester aufgenommen und die Produkte werden mittels Säulenchromatographie (EE) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 28 mg (0.14 mmol) = 67 %.

## 9.16 Versuche zu Kapitel 4

### 9.16.1 Expression von RmIC in *E. coli*

#### 1. „Über-Nacht-Kultur“

In zwei sterile Reagenzgläser werden jeweils 5 mL steriles LB-Medium gegeben. Das Medium wird mit 5 µL Carbenicillin (100 mg/mL) versetzt. Mit einem sterilen Zahnstocher wird etwas aus dem Glycerinstock entnommen und in je eines der Reagenzgläser gegeben. Die Kultur wird über Nacht bei 27°C und 250 rpm geschüttelt.

#### 2. Expression von RmCI

In zwei sterile Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen werden 3 g LB-Medium gegeben und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 150 mL aufgefüllt. Im Anschluss werden 150 µL Ampicillinlösung (100 mg/mL) zugesetzt. Diese Lösungen werden mit je 1500 µL einer „Über-Nacht-Kultur“ beimpft. Es wird 2 – 3 Std. bei 37°C und 60 rpm geschüttelt, bis die optische Dichte 0.6 bis 0.9 bei 590 nm beträgt. Dann werden 60 µL IPTG-Lösung (1M, Endkonzentration 0.4 mM) zugesetzt. Nach weiteren 4-6 Std. (Schütteln bei 27°C und 250 rpm) werden die Zellen durch Zentrifugation (20 min bei 10000 rpm) geerntet. Die Zellen werden in Phosphatpuffer (10 mM) pH 7.5 aufgenommen und mittels Ultraschall (4 x 30 s bei 30 Watt) aufgeschlossen. Das Enzym wird nach dem Qiagen Protokoll (FPLC purification of 6x His-tagged proteins from *E. coli* using Ni-NTA superflow under native conditions)

mittels Qiagen Spin Columns aufgereinigt und die Expression über eine SDS-Page überprüft.



**Abbildung 59:** SDS-Page der Expression von RmCI

### 9.16.2 Expression von RmID in *E. coli*

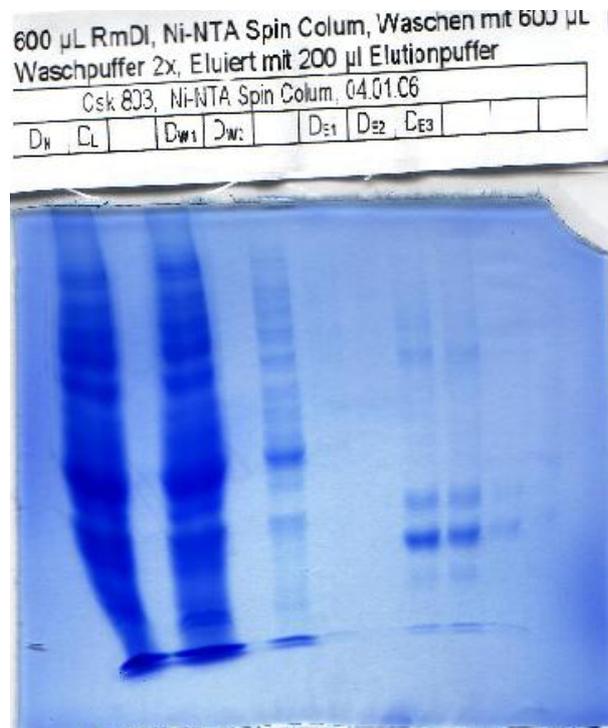
#### 1. „Über-Nacht-Kultur“

In zwei sterile Reagenzgläser werden jeweils 5 mL steriles LB Medium gegeben. Das Medium wird mit 5  $\mu$ L Carbenicillin (100 mg/mL) versetzt. Mit einem sterilen Zahnstocher wird etwas aus dem Glycerinstock entnommen und in je eines der Reagenzgläser gegeben. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C und 60 rpm geschüttelt.

#### 2. Expression von RmDI

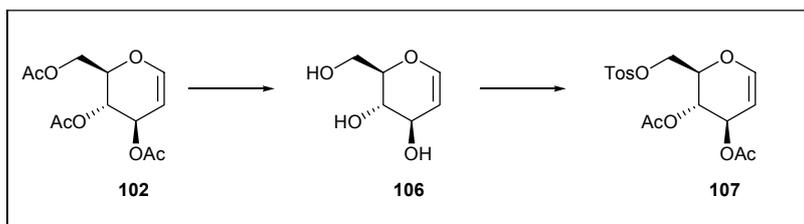
In zwei sterile Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen werden 3 g LB-Medium gegeben und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 150 mL aufgefüllt. Im Anschluss werden 150  $\mu$ L Ampicillinlösung (100 mg/mL) zugesetzt. Diese Lösungen werden mit je 1500  $\mu$ L einer „Über-Nacht-Kultur“

beimpft. Es wird 3-4 Std. bei 27°C und 250 rpm geschüttelt, bis die OD 0.6 bis 0.9 bei 590 nm beträgt. Dann werden 15 µL IPTG-Lösung (1M, Endkonzentration 0.1 mM) zugesetzt. Nach weiteren 20 Std. (Schütteln bei 24°C und 250 rpm) werden die Zellen durch Zentrifugation (20 min bei 10000 rpm) geerntet. Die Zellen werden in Phosphatpuffer (10 mM) pH 7.5 aufgenommen und mittels Ultraschall (4 x 30 s. bei 30 Watt) aufgeschlossen. Das Enzym wird nach dem Qiagen Protokoll (FPLC purification of 6x His-tagged proteins from *E. coli* using Ni-NTA superflow under native conditions) mittels Qiagen Spin Columns aufgereinigt und die Expression über eine SDS-Page überprüft.



**Abbildung 60:** SDS-Page der Expression von RmDI

## 9.17 Versuche zu Kapitel 7.1

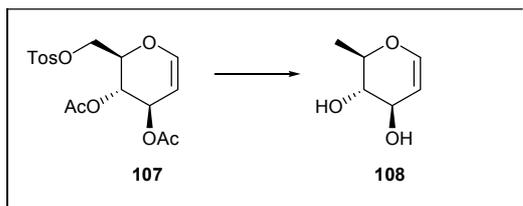
9.17.1 Entschützung von und Tosylierung Tri-O-acetyl-D-glucal **102**6-*p*-Tolylsulfonyl-3,4-di-O-acetyl-D-glucal (**107**)

Zu einer Lösung von 50.00 g (184.0 mmol) Tri-O-acetyl-D-glucal in 500.0 mL Methanol werden unter Eiskühlung 2.06 g (90.0 mmol) Natrium gegeben und im Anschluss eine Stunde lang gerührt. Die basische Reaktionslösung wird mit DOWEX 50 W8 neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach fünfmaliger Codestillation mit je 50 mL Toluol werden 300.0 mL Dichlormethan, 1.15 g NMe<sub>3</sub>·HCl, sowie 63.7 mL NEt<sub>3</sub> zugegeben. Unter Eiskühlung wird die Reaktionsmischung über einen Zeitraum von einer Stunde mit insgesamt 41.6 g (219.0 mmol) *p*-Toluolsulfonylchlorid versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 5 Std. bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Wasser hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige wird mit Dichlormethan (3x 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wird mit 243 mL (1.8 mmol) NEt<sub>3</sub> und 122 mL Acetanhydrid versetzt und über 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung mit Wasser hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert (3x 300 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 4:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 42.9 g (112.0 mmol)= 47 %.

Die spektroskopischen Daten entsprechen den von A. Schönberger berichteten.<sup>180</sup>

<sup>180</sup> A. Schönberger, *Dissertation* Technische Universität Clausthal, **2001**

## 9.17.2 Darstellung von D-Rhamninal (108)

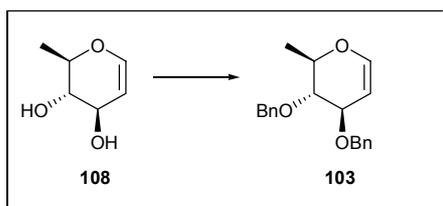


Zu einer Suspension von 21.27 g Lithiumaluminiumhydrid in 200 mL Et<sub>2</sub>O wird, unter Eiskühlung, über einen Zeitraum von 2 Std. eine Lösung von 42.9 g **105** in 400 mL Et<sub>2</sub>O getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird noch 2 Std. bei RT gerührt. Anschließend wurde langsam unter Eiskühlung mit 24 ml Wasser, 24 mL NaOH-Lsg. (4 N) und abschließend mit 56 mL Wasser hydrolysiert. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit EE gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Produkt wird in einer Ausbeute von 14.5 g (111.0 mmol, 99.5 %) erhalten.

Die spektroskopischen Daten entsprechen den von A. Schönberger berichteten.<sup>179</sup>

## 9.17.3 Benzylierung von D-Rhamninal

1,5-Anhydro-3,4-di-O-acetyl-2,6-dideoxy-D-arabino-hex-1-enit (**103**)



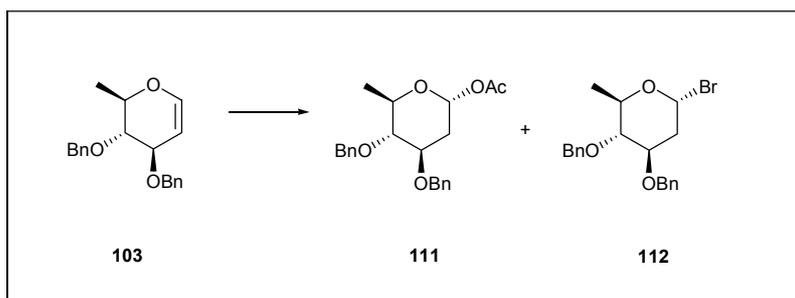
Zu einer Lösung von 500 mg (3.84 mmol) D-Rhamninal in 10 ml THF werden unter Eiskühlung 452 mg (18.84 mmol) NaH gegeben. Anschließend werden 1.2 mL (2.64 mmol) Benzylbromid sowie 48 mg 80.13 mmol) TBAI zugeben und bei 75°C unter Rückfluss erhitzt. Nach Hydrolyse mit NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. wird mit EE (5x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 50:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 632 mg (2.04 mmol)= 53 %.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>181</sup>

#### 9.17.4 Darstellung des Acylglycosids

Acetyl 1,5-Anhydro-3,4-di-*O*-benzyl-2,6-didesoxy- $\alpha$ -D-*arabino*-pyranose (**111**);

Bromo 1,5-Anhydro-3,4-di-*O*-benzyl-2,6-didesoxy- $\alpha$ -D-*arabino*-pyranose (**112**)



Zu einer Lösung von 4.0 g (12.9 mmol) **103** in 80 mL Dichlormethan werden 1.5 mL (26.0 mmol) Eisessig, 1.2 mL (12.9 mmol) Acetanhydrid getropft. Unter Eiskühlung werden 221 mg (0.65 mmol)  $\text{PPh}_3\text{HBr}$  über 30 min. in drei Portionen zur Reaktionsmischung gegeben und anschließend 5 Std. bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert (3 x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 20:1) aufgereinigt. Die Ausbeute beträgt für **111** 3.467 g (9.29 mmol) = 72% und für **112** 207 mg (0.65 mmol) = 5%.

Acylglycosid **111**:

**Rf**: 0.16 (PE : EE = 10:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 7.38 - 7.29$  (m, 10 H, -OBn), 6.16 (dd,  $J = 7.6$  und 1.6 Hz, 1 H, H - 1), 4.97 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1 H, -OBn), 4.69 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1 H, -OBn), 4.67 (s, 2 H, -OBn), 3.96 (ddd,  $J = 11.5, 8.7$  und 5.0 Hz, 1 H, H - 3), 3.62 (dq,  $J = 8.7$  und 6.2 Hz, 1 H, H - 5), 3.20 (t,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H - 4), 2.48 (ddd,  $J = 13.5, 5.0$  und 1.6 Hz, 1 H, H - 2'<sub>aq</sub>), 2.06 (s, 3 H, -OAc), 1.81 (ddd,  $J = 13.5, 7.6$  und 5.0 Hz, 1 H, H - 2'<sub>ax</sub>), 1.31 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H, H - 6) ppm.

<sup>181</sup> R. W. Franck, N. Kaila, *Carbohydr. Res.*, **1993**, 239, 71 – 84.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 169.5 (C<sub>q</sub>, -OAc), 138.3 (C<sub>q</sub>, -OBn), 138.2 (C<sub>q</sub>, -OBn), 128.4 (CH, -OBn), 128.3 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.6 (CH, -OBn), 91.8 (CH, C – 4'), 83.6 (CH, C – 3'), 76.7 (CH, C – 5'), 75.4 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 71.8 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 69.8 (CH, C – 1'), 34.5 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 21.1 (CH<sub>3</sub>, -OAc) 18.2 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

Bromid **112**:

**Rf**: 0.48 (PE : EE = 10:1).

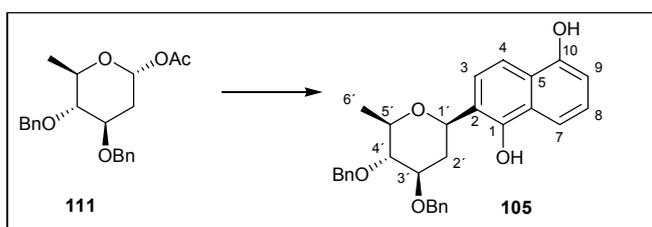
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 7.38 – 7.29 (m, 10 H, -OBn), 4.99 (dd, *J* = 7.6 und 1.4 Hz, 1 H, H – 1), 4.68 (d, *J* = 10.9 Hz, 1 H, -OBn), 4.66 (s, 3 H, -OBn), 4.44 (d, *J* = 10.9 Hz, 1 H, -OBn), 4.02 (ddd, *J* = 11.5, 9.2 und 5.0 Hz, 1 H, H – 3), 3.82 (dq, *J* = 9.2 und 6.2 Hz, 1 H, H – 5), 3.20 (t, *J* = 9.2 Hz, 1 H, H – 4), 2.35 (ddd, *J* = 13.0, 5.0 und 1.4 Hz, 1 H, H – 2'<sub>aq</sub>), 1.81 (ddd, *J* = 13.0, 7.6 und 5.0 Hz, 1 H, H – 2'<sub>ax</sub>), 1.31 (d, *J* = 6.2 Hz, 3 H, H – 6) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 138.7 (C<sub>q</sub>, -OBn), 138.6 (C<sub>q</sub>, -OBn), 128.4 (CH, -OBn), 128.3 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.6 (CH, -OBn), 96.5 (CH, C – 4'), 84.3 (CH, C – 3'), 77.5 (CH, C – 5'), 75.3 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 71.8 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 67.4 (CH, C – 1'), 35.8 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 18.2 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

## 9.18 Versuche zu Kapitel 7.2

### 9.18.1 C-Glycosylierung mit 1-Acetyl-3,4-di-O-benzyl-D-rhamnosid **111**

1-(1,10-Dihydroxynaphthalin)-3,4,di-O-benzyl-β-D-arabino-tetrahydro-pyran (**105**)



Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung aus 51 mg (0.138 mmol) Glycosylacetats und 22 mg (0.138 mmol) 1,5-Dihydroxynaphthalin in 2 mL Acetonitril 21  $\mu$ L (24 mg, 0.165 mmol) Bortrifluoretherat langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird 60 min. bei RT gerührt und dann mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc/EE/MeOH = 10:0.5:0.5) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 37 mg (0.077 mmol) = 55 %.

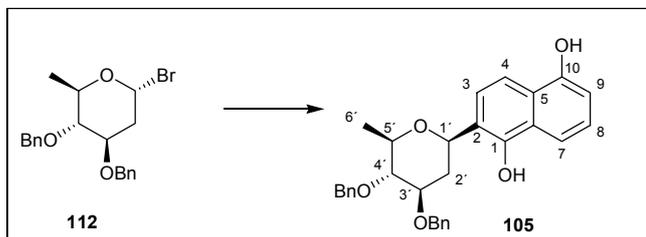
**Rf:** 0.48 (Dichlormethan : Methanol = 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):  $\delta$  = 8.75 (s, 1 H, -OH), 8.73 (s, 1 H, -OH), 7.84 (dd,  $J$  = 8.5 und 1.0 Hz, 1 H, H – 4), 7.65 (dd,  $J$  = 8.7 und 0.9 Hz, 1 H, H – 7), 7.42 - 7.27 (m, 11 H, H – 8, -OBn), 7.03 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1 H, H – 3), 6.80 (dd,  $J$  = 7.4 und 1.0 Hz, 1 H, H – 9), 5.02 (d,  $J$  = 10.9 Hz, 1 H, -OBn), 4.79 (dd,  $J$  = 12.0 und 2.2 Hz, 1 H, H - 1'), 4.73 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 1 H, -OBn), 4.73 (d,  $J$  = 10.9 Hz, 1 H, -OBn), 4.65 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 1 H, -OBn), 3.82 (ddd,  $J$  = 11.3, 9.0 und 4.9 Hz, 1 H, H – 3'), 3.62 (dq,  $J$  = 9.0 und 6.2 Hz, 1 H, H – 5'), 3.30 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 1 H, H – 4'), 2.48 (ddd,  $J$  = 13.4, 4.9 und 2.2 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 2.00 (ddd,  $J$  = 13.4, 12.0 und 11.3 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.45 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 3 H, H – 6) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm):  $\delta$  = 151.1 (C<sub>q</sub>, C – 10), 150.8 (C<sub>q</sub>, C – 1), 138.3 (C<sub>q</sub>, -OBn), 138.2 (C<sub>q</sub>, -OBn), 128.4 (CH, -OBn), 128.1 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.6 (CH, -OBn), 126.8 (C<sub>q</sub>, C – 5), 125.2 (CH, C – 8), 124.8 (C<sub>q</sub>, C – 6), 123.6, (CH, C – 3), 118.0 (C<sub>q</sub>, C – 2), 114.8 (CH, C – 4), 113.0 (CH, C - 7), 109.2 (CH, C – 9), 83.4 (CH, C – 4'), 80.3 (CH, C – 3'), 79.3 (CH, C – 5'), 76.4 (CH, C – 1'), 75.5 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 71.4 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 37.1(CH<sub>2</sub> C – 2'), 18.6 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

### 9.18.2 C-Glycosylierung mit Benzylolivose (D)

1-(1,10-Dihydroxynaphthalin) 3,4,di-*O*-benzyl- $\beta$ -D-*arabino*- tetrahydro-pyran (**105**)



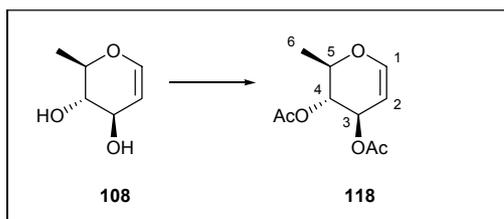
Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung aus 16 mg (0.040 mmol) Glycosylacetats und 6 mg (0.040 mmol) 1,5-Dihydroxynaphthalin in 1 mL Acetonitril 6  $\mu$ L (7 mg, 0.050 mmol) Bortrifluoretherat langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird 60 min. bei RT gerührt und dann mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc/EE/MeOH = 10:0.5:0.5) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 10 mg (0.021 mmol) = 53 %.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus Kapitel 9.12.5 überein.

## 9.19 Versuche zu Kapitel 7.3

### 9.19.1 Acetylschätzung von D-Rhamnal<sup>182</sup>

1,5-Anhydro-3,4-di-*O*-acetyl-2,6-didesoxy-D-*arabino*-hex-1-enit (**118**)



<sup>182</sup> J. Boivin, A. Montagnac, C. Monnoret, M. Pais, *Carbohydr. Res.*, **1980**, *85*, 223 – 242.

Zu einer Lösung von 2.00 g (15.4 mmol) D-Rhamnal in 30 mL  $\text{NEt}_3$  werden unter Eiskühlung 14.4 mL (153.7 mmol) Acetanhydrid gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei RT 12 Std. gerührt. Die Reaktionsmischung wird in 100 mL Diethylether aufgenommen und die organische Phase mit Wasser (2 x 50 mL), HCl (1 x 30 mL, 1N) und  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (2 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel vorsichtig im Vakuum entfernt (Produkt ist flüchtig!). Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie (Pentan/ $\text{Et}_2\text{O}$  = 30:1  $\rightarrow$  20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 2.23 g (10.4 mmol) = 68%.

**Rf:** 0.51 (PE : EE = 5:1).

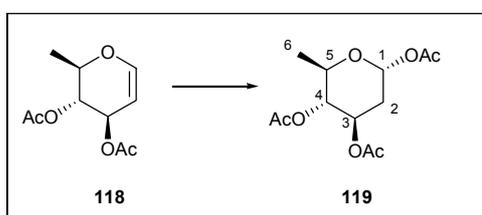
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  = 7.26 ppm):  $\delta$  = 6.42 (dd,  $J$  = 6.1 und 1.4 Hz, 1 H, H - 1), 5.33 (dddd,  $J$  = 6.1, 3.0, 1.4 und 0.6 Hz, 1 H, H - 2), 3.20 (dd,  $J$  = 8.2 und 6.1 Hz, 1 H, H - 4), 3.96 (dd,  $J$  = 6.1 und 3.0 Hz, 1 H, H - 3), 3.62 (dq,  $J$  = 8.2 und 6.6 Hz, 1 H, H - 5), 2.06 (s, 3 H, -OAc), 2.01 (s, 3 H, -OAc), 1.30 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3 H, H - 6) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  = 77.0 ppm):  $\delta$  = 170.6 ( $\text{C}_q$ , -OAc), 169.8 ( $\text{C}_q$ , -OAc), 145.9 (CH, C - 1), 98.7 (CH, C - 2), 72.4 (CH, C - 4), 71.7 (CH, C - 3), 68.2 (CH, C - 5), 21.0 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 20.8 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 16.5 ( $\text{CH}_3$ , C - 6') ppm.

Gelblicher amorpher Feststoff; MG = 214.22 g/mol.

### 9.19.2 Darstellung des Acylglycosids

Acetyl 1,5-Anhydro-3,4-di-O-acetyl-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-arabino-pyranose (**119**)



Zu einer Lösung von 2.23 g (10.4 mmol) **118** in 80 mL Dichlormethan werden 1.2 mL (20.8 mmol) Eisessig, 1.0 mL (10.4 mmol) Acetanhydrid getropft. Unter Eiskühlung werden 714 mg (2.58 mmol)  $\text{PPh}_3\text{HBr}$  über 30 min. in drei Portionen zur Reaktionsmischung gegeben und anschließend 5 Std. bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung

wird mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert (3 x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 2.396 g (8.74 mmol) = 84%.

**Rf:** 0.21 (PE : EE = 5:1).

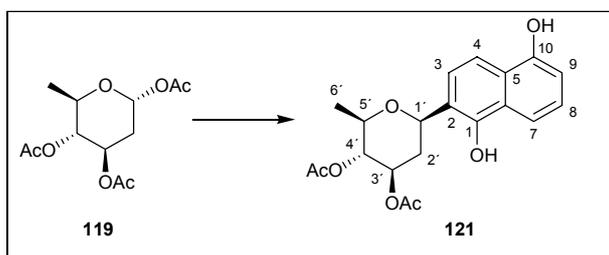
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 6.17$  (dd,  $J = 3.6$  und  $1.4$  Hz, 1 H, H - 1),  $5.26$  (ddd,  $J = 11.6$ ,  $9.6$  und  $5.4$  Hz, 1 H, H - 3),  $4.79$  (t,  $J = 9.6$  Hz, 1 H, H - 4),  $3.93$  (dq,  $J = 9.6$  und  $6.2$  Hz, 1 H, H - 5),  $2.48$  (ddd,  $J = 13.5$ ,  $5.4$  und  $1.4$  Hz, 1 H, H -  $2_{\text{äq}}$ ),  $2.11$  (s, 3 H, -OAc),  $2.05$  (s, 3 H, -OAc),  $2.02$  (s, 3 H, -OAc),  $1.91$  (ddd,  $J = 13.5$ ,  $11.6$  und  $3.6$  Hz, 1 H, H -  $2_{\text{ax}}$ ),  $1.18$  (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H, H - 6) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 170.3$  ( $\text{C}_q$ , -OAc),  $170.0$  ( $\text{C}_q$ , -OAc),  $169.2$  ( $\text{C}_q$ , -OAc),  $90.8$  (CH, C - 4),  $74.1$  (CH, C - 3),  $68.4$  (CH, C - 5),  $68.2$  (CH, C - 1'),  $34.1$  ( $\text{CH}_2$  C - 2),  $21.0$  ( $\text{CH}_3$ , -OAc),  $20.9$  ( $\text{CH}_3$ , -OAc),  $20.7$  ( $\text{CH}_3$ , -OAc),  $17.6$  ( $\text{CH}_3$ , C - 6) ppm.

Gelbes Öl, MG = 274.27 g/mol.

### 9.19 3 C-Glycosylierung mit 1,3,4-Tri-O-acetyl-D-olivose

1-(1,10-Dihydroxynaphthalin)-3,4-di-O-acetyl- $\beta$ -D-arabino-tetrahydro-pyran (**121**)



Unter Ausschluss von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden 100 mg (0.37 mmol) des Acylglycosids **119** in 3 mL Acetonitril gelöst und mit 88 mg (0.55 mmol) 1,5-Dihydroxynaphthalin versetzt. Unter Eiskühlung werden 70  $\mu\text{L}$  (78 mg, 0.55 mmol) Bortrifluoretherat (verdünnt auf 700  $\mu\text{L}$  mit Acetonitril) mittels einer Spritzenpumpe über einen Zeitraum von 60 min. langsam zugetropft. Im Anschluss wird die Reaktionslösung

noch 45 min. bei RT unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 3 mL NaHCO<sub>3</sub>-Lösung hydrolysiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 79 mg (0.21 mmol) = 57 %.

**Rf:** 0.17 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 7.81 (dd, *J* = 8.5 und 1.0 Hz, 1 H, H - 4), 7.66 (dd, *J* = 8.7 und 0.9 Hz, 1 H, H - 7), 7.28 (dd, *J* = 8.5 und 7.4 Hz), 6.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, H - 3), 6.84 (dd, *J* = 7.4 und 1.0 Hz, 1 H, H - 9), 5.14 (ddd, *J* = 11.4, 9.5 und 5.2 Hz, 1 H, H - 3'), 4.95 (t, *J* = 9.5 Hz, 1 H, H - 4'), 4.86 (dd, *J* = 11.8 und 2.2 Hz, 1 H, H - 1'), 3.62 (dq, *J* = 9.5 und 6.2 Hz, 1 H, H - 5'), 2.45 (ddd, *J* = 13.3, 5.2 und 2.2 Hz, 1 H, H - 2'\_{aq}), 2.11 (s, 3 H, -OAc), 2.06 (ddd, *J* = 13.3, 11.8 und 11.4 Hz, 1 H, H - 2'\_{ax}), 2.03 (s, 3 H, -OAc), 1.36 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H, H - 6) ppm.

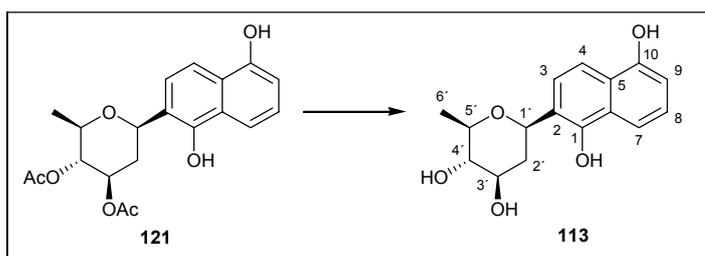
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 170.8 (C<sub>q</sub>, -OAc), 170.3 (C<sub>q</sub>, -OAc), 151.5 (C<sub>q</sub>, C - 10), 150.5 (C<sub>q</sub>, C - 1), 126.8 (C<sub>q</sub>, C - 5), 125.4 (CH, C - 8), 125.1 (C<sub>q</sub>, C - 6), 123.3, (CH, C - 3), 117.0 (C<sub>q</sub>, C - 2), 114.4 (CH, C - 4), 113.4 (CH, C - 7), 109.3 (CH, C - 9), 79.0 (CH, C - 4'), 75.18 (CH, C - 3'), 73.9 (CH, C - 5'), 71.7 (CH, C - 1'), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C - 2'), 20.9 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 20.8 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 18.0 (CH<sub>3</sub>, C - 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M - H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>7</sub>: 373.1087 gefunden: 373.1091.

Gelbliches Öl, C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>, MG = 374.14 g/mol.

### 9.19.3 Entschützung des Glycosids

1-(1,10-Dihydroxynaphthalin)-β-D-*arabino*-tetrahydro-pyran (**113**)



111 mg (0.30 mmol) des C-Glycosids **121** werden in 10 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (1:1) gelöst und mit 564 mg (2.97 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und 72 h auf 38°C erhitzt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit Phosphatpuffer (pH 7.0) aufgenommen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/MeOH = 10:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 68 mg (0.24 mmol) = 79 %.

**Rf:** 0.16 (Petrolether : Essigsäureethylester = 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm):  $\delta$  = 7.90 – 7.88 (brd,  $J$  = 6.8 Hz, 1 H, H - 4), 7.86 – 7.84 (bd,  $J$  = 7.2 Hz, 1 H, H - 7), 7.44 - 7.39 (m, 2 H, H - 3, H - 8), 6.99 (dd,  $J$  = 7.4 und 0.9 Hz, 1 H, H - 9), 5.16 (dd, 1 H,  $J$  = 11.6 und  $J$  = 2.1 Hz, 1 H, H - 1'), 3.92 (ddd,  $J$  = 11.3, 8.8 und 5.0 Hz, 1 H, H - 3'), 3.70 (qd,  $J$  = 9.2 und 6,2 Hz, 1 H, H - 5'), 3.31 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 1 H, H - 4'), 2.45 (ddd,  $J$  = 11.6, 5.0 und 2.1 Hz, 1 H, H - 2<sub>ax</sub>), 1.96 (ddd,  $J$  = 12.3, 12.3 und 11.6 Hz, 1 H, H - 2<sub>ax</sub>), 1.59 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3 H, - 6') ppm.

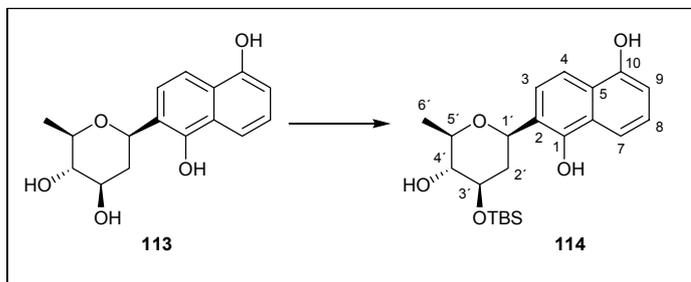
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, MeOD = 49.0 ppm):  $\delta$  = 154.3 (C<sub>q</sub>, C - 10), 150.6 (C<sub>q</sub>, C - 1), 128.18 (C<sub>q</sub>, C - 5), 126.7 (C<sub>q</sub>, C - 6), 126.4 (CH, C - 8), 124.1, (CH, C - 3), 121.6 (C<sub>q</sub>, C - 2), 114.9 (CH, C - 4), 114.0 (CH, C - 7), 109.2 (CH, C - 9), 78.6 (CH, C - 4'), 77.9 (CH, C - 3'), 77.5 (CH, C - 5'), 73.5 (CH, C - 1'), 41.5 (CH<sub>2</sub>, C - 2'), 18.7 (CH<sub>3</sub>, C - 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M - H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>: 298.1080 gefunden: 289.1076.

Gelbliches Öl, C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>, MG = 290.31 g/mol.

### 9.19.4 Selektive Silylierung des Glycosids **113** an Position 3'

1-(1,10-Dihydroxynaphthalin)-3-tertbutyl-dimethylsilyl- $\beta$ -D-*arabino*- tetrahydro-pyran (**114**)



Unter Ausschluss von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden 170 mg (0.61 mmol) des Glycosids **113** in DMF gelöst. Unter Eiskühlung werden 70  $\mu$ L (64 mg, 0.60 mmol) 2,6-Lutidin zu getropft. Nach 5 min. werden 95  $\mu$ L (109 mg, 0.41 mmol) tert-Butyldimethylsilyl-trifluoromethansulfonat langsam zu getropft. Anschließend wird 2 Std. bei RT gerührt. Danach werden weitere 22  $\mu$ L (20 mg, 0.19 mmol) 2,6-Lutidin und im Anschluss 43  $\mu$ L (49 mg, 0.19 mmol) tert-Butyldimethylsilyltrifluoromethansulfonat zu getropft. Es wird wiederum 1 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc/EE = 15:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 192 mg (0.33 mmol) = 91 %.

**Rf:** 0.75 (Dichlormethan : Methanol = 10:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, Aceton = 2.05 ppm):  $\delta$  = 8.91 (s, 1 H, -OH), 8.67 (s, 1 H, -OH), 7.73 - 7.70 (m, 2 H, H - 4, H - 7), 7.27 - 7.19 (m, 2 H, H - 3, H - 8), 6.88 (dd,  $J$  = 7.5 und 0.7 Hz, 1 H, H - 9), 5.01 (dd,  $J$  = 11.8, 2.1 Hz, 1 H, H - 1'), 4.22 (d,  $J$  = 5.44 Hz, 1 H, -OH), 3.90 (ddd,  $J$  = 12.2, 8.4, 5.0 Hz, 1 H, H - 3'), 3.57 (qd,  $J$  = 9.3, und 6.1 Hz, 1 H, H - 5'), 3.21 (ddd,  $J$  = 9.3, 7.2 und 7.2 Hz, 1 H, H - 4'), 2.27 (ddd,  $J$  = 13.1, 5.0 und 2.1 Hz, 1 H, H - 2'\_{aq}), 1.85 (ddd,  $J$  = 12.2, 12.2 und 11.8 Hz, 1 H, H - 2'\_{ax}), 1.42 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3 H, H - 6'), 0.89 (s, 9 H, -OTBS), 0.15 (s, 3 H, -OTBS), 0.13 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz, Aceton = 206.3 ppm):  $\delta$  = 153.88 ( $\text{C}_q$ , C - 10), 150.9 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 127.8 ( $\text{C}_q$ , C - 6), 126.5 ( $\text{C}_q$ , C - 5), 126.2 (CH, C - 3), 124.3 (CH, C - 8), 114.4 (CH, C - 7), 114.1 (CH, C - 4), 109.3 (CH, C - 9), 78.4 (CH, C - 4'), 78.2 (CH, C - 5'), 77.9

(CH, C – 1'), 74.7 (CH, C – 3'), 42.5 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 26.3 (CH<sub>3</sub>, -OTBS), 18.8 (CH<sub>3</sub>, C – 6'), -4.1 (CH<sub>3</sub>, -OTBS), -4.4 (CH<sub>3</sub>, OTBS) ppm.

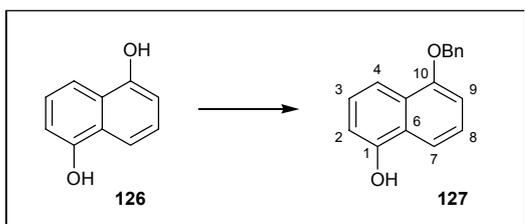
**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>Si : 403.1809, gefunden: 403.1807.

Farbloses Öl, C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>Si, MG = 404.57 g/mol.

## 9.20 Versuche zu Kapitel 7.4

### 9.20.1 Benzylierung von 1,5-Dihydroxynaphthalin

10-(Benzyloxy)-naphthalin-1-ol (**127**)



Unter Ausschluss von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden 3.00 g (18.73 mmol) 1,5-Dihydroxynaphthalin **126** in 200 mL THF/DMF (1:1) gelöst. Bei 0°C werden 7.77 g (56.19 mmol) Kaliumcarbonat und 0.92 g (2.81 mmol) TBAI zugegeben. Nach 15 Minuten werden 2.25 mL (3.24 g, 18.92 mmol) Benzylbromid über einen Zeitraum von 20 Minuten mittels einer Spritzenpumpe zu getropft. Die Reaktionsmischung wird 3 Std. bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit HCl (1 N) neutralisiert und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird 5-mal mit 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Flashchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester = 5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 1.61 g (6.43 mmol) = 34%.

**Rf:** 0.35 (Petrolether : Essigsäureethylester = 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 7.98 – 7.97 (m, 1 H, H – 4), 7.80 - 7.77 (m, 1 H, H – 7), 7.55 – 7.54 (m, 2 H, H – 8, H – 3), 7.46 – 7.30 (m, 5 H, -OBn), 6.93 (dd, *J* = 7.7 und 1.0 Hz, 1 H, H – 9), 6.86 (dd, *J* = 7.7 und 1.0 Hz, 1 H, H – 2) ppm.

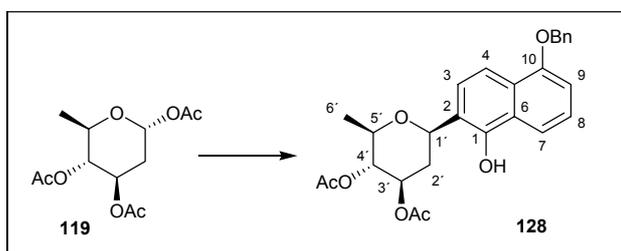
**<sup>13</sup>C-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 154.3 (C<sub>q</sub>, C – 10), 151.2 (C<sub>q</sub>, C – 1), 137.1, (C<sub>q</sub>, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 127.9 (CH, C – 8), 127.8 (CH, C – 3), 127.3 (CH, -OBn), 127.1 (C<sub>q</sub>, C – 6), 125.4 (C<sub>q</sub>, C – 5), 125.2 (CH, -OBn), 114.9 (CH, C – 4), 113.9 (CH, C – 7), 109.5 (CH, C – 2), 105.8 (CH, C – 9), 70.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn) ppm.

**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>: 249.0916, gefunden: 249.0919.

zitronengelber kristalliner Feststoff, C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>, MG = 250.29 g/mol; Schmelzpunkt: 134.5°C. Der Schmelzpunkt stimmt mit dem Literaturwert überein.<sup>183</sup>

### 9.20.2 Kupplung mit 1,5-Dihydroxynaphthalinderivat

1-(10-(benzyloxy)-naphthalin-1-ol)-3,4-di-O-acetyl-β-D-arabino-tetrahydro-pyran (**128**)



Unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff werden 500 mg (1.823 mmol) des Acylglycosids **119** und 913 mg des Aromaten (3.646 mmol) in absolutem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung werden 100 mg Molsieb (5 Å) gegeben. Bei -30°C werden 459 µL (518 mg, 3.646 mmol) Bortrifluoretherat (verdünnt auf 1500 µL mit abs. Dichlormethan), tropfen weise zu der Reaktionslösung gegeben. Während der Zugabe wird die Lösung tief rot. Nach Beendigung der Zugabe wird die Reaktionslösung langsam über 10 Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsmischung wird weitere 12 Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Mischung mit Wasser hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. (3x 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach

<sup>183</sup> J. Becher, O.A. Matthews, M. B. Moyens, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Syn. Lett.*, **1999**, *3*, 330 - 332.

Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Flashchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester = 20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 326 mg (0.702 mmol) = 39%.

**Rf:** 0.28 (Cyclohexan : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19.8$  (c = 1.01, CHCl<sub>3</sub>).

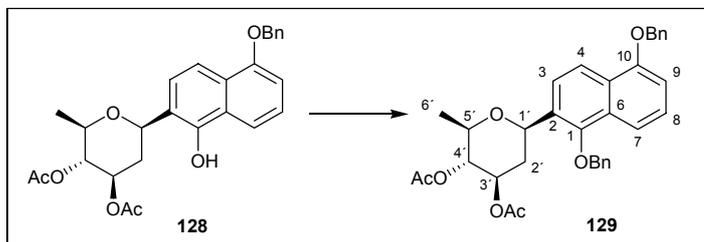
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):  $\delta = 8.44$  (s, 1 H, -OH), 7.89 – 7.83 (m, 2 H, H – 4, H – 7), 7.53 - 7.51 (m, 1 H, H – 8), 7.44 – 7.36 (m, 5 H, -OBn), 7.02 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H – 3), 6.90 (dd,  $J = 7.65$  und 0.88 Hz, 1 H, H – 9), 5.22 (s, 2 H, -OBn), 5.17 (ddd,  $J = 11.4$ , 9.6 und 5.2 Hz, 1 H, H – 3'), 4.98 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1 H, H – 4'), 4.91 (dd,  $J = 11.7$  und 2.3 Hz, 1 H, H – 1'), 3.75 (dq,  $J = 9.6$  und 6.3 Hz, 1 H, H – 5'), 2.47 (ddd,  $J = 11.7$ , 5.2 und 2.3 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.13 (s, 3 H, -OAc), 2.09 (ddd,  $J = 25.0$ , 11.7 und 11.4 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 2.03 (s, 3 H, -OAc), 1.39 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm):  $\delta = 170.3$  (C<sub>q</sub>, -OAc), 170.0 (C<sub>q</sub>, -OAc), 154.0 (C<sub>q</sub>, C – 10), 150.4 (C<sub>q</sub>, C – 1), 137.0 (C<sub>q</sub>, -OBn), 128.4 (CH, -OBn), 128.4 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 126.4 (C<sub>q</sub>, C – 5), 126.3 (C<sub>q</sub>, C – 6), 125.2 (CH, C – 8), 123.3, (CH, C – 3), 117.2 (C<sub>q</sub>, C – 2), 114.5 (CH, C – 4), 113.8 (CH, C – 7), 105.9 (CH, C – 9), 79.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 75.0 (CH, C – 4'), 73.8 (CH, C – 3'), 71.6 (CH, C – 5'), 69.9 (CH, C – 1'), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 20.8 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 20.7 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 17.9 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>: 463.1757, gefunden: 463.1765.

Gelblicher Schaum, C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub>, MG = 464.51 g/mol.

## 9.20.3 Benzylierung des Glycosids 128

1-(1,10-bis(benzyloxy)naphthalin)-3,4-di-O-acetyl- $\beta$ -D-arabino-tetrahydro-pyran (**129**)

Unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff werden 400 mg (0.86 mmol) des Glycosids **128** in 20 mL THF gelöst. Im Anschluss werden 318 mg (0.86 mmol) Tetrabutylammoniumiodid und 6 mL Benzylbromid hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 0°C gekühlt und nach 10 Minuten werden 400 mg (1.72 mmol) Silberoxid hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 Std bei 0°C stark gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Silberoxid über Kieselgur abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc → Cyc/EE 10:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 408 mg (0.74 mmol) = 86 %.

**Rf:** 0.27 (Cyclohexan : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -22.1$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):  $\delta$  = 8.21(d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H – 4), 7.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H – 7), 7.56 – 7.35 (m, 12 H, H – 3, H – 8, -OBn), 6.92 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H, H – 9), 5.27 (s, 2 H, -OBn), 5.15 (d, *J* = 11.5 Hz, 1 H, -OBn), 5.11 (ddd, *J* = 11.4, 9.0 und 2.3 Hz, 1 H, H – 3'), 5.07 (d, *J* = 11.5 Hz, 1 H, -OBn), 4.97 (dd, *J* = 11.5 und 1.9 Hz, 1 H, H – 1'), 4.87 (t, *J* = 9.5 Hz, 1 H, H – 4'), 3.54 (dq, *J* = 9.5 und 6.1 Hz, 1 H, H – 5'), 2.22 (ddd, *J* = 12.9, 5.3 und 2.1 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.20 (s, 3 H, -OAc), 2.10 (s, 3 H, -OAc), 2.09 (ddd, *J* = 12.7, 11.7 und 11.7 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.25 (d, *J* = 6,3 Hz, 3 H, H – 6') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm):  $\delta$  = 170.3 (C<sub>q</sub>, -OAc), 170.2 (C<sub>q</sub>, -OAc), 154.8 (C<sub>q</sub>, C – 10), 151.2 (C<sub>q</sub>, C – 1), 137.2 (C<sub>q</sub>, -OBn), 136.9 (C<sub>q</sub>, -OBn), 129.8 (C<sub>q</sub>, C – 6), 129.0 (C<sub>q</sub>, C – 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 128.2 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.2 (CH, -OBn), 127.0 (CH, -OBn), 127.0 (CH, C – 8), 126.2 (CH, C – 3), 123.3 (CH, C – 4), 119.1 (C<sub>q</sub>, C – 2), 114.8 (CH, C – 7), 105.8 (CH,

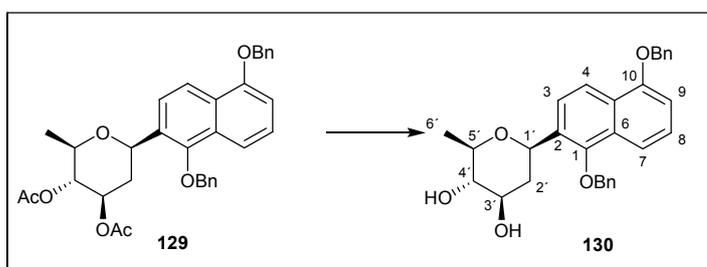
C - 9), 77.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 74.7 (CH, C - 5'), 74.4 (CH, C - 4'), 72.3 (CH, C - 3'), 71.8 (CH, C - 1'), 70.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 37.4 (CH<sub>2</sub> C - 2'), 20.9 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 20.9 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 18.0 (CH<sub>3</sub>, C - 6') ppm.

**EI-MS:** (M<sup>+</sup>) berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>: 554.2305, gefunden: 554.2309.

Gelbes Öl, C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>, MG = 554.63 g/mol.

### 9.20.4 Entschützung des Glycosids **129**

1-(1,10-bis(benzyloxy)naphthalin)-β-D-*arabino*- tetrahydro-pyran (**130**)



470 mg (0.85 mmol) des Glycosids **129** werden in 10 mL Dichlormethan gelöst. Im Anschluss werden 10 mL Methanol und 7 mg (0.13 mmol) Natriummethanolat hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit 20 mL Phosphatpuffer (pH 7.0) versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester=20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 404 mg (0,84 mmol) = 99%.

**Rf:** 0.15 (Petrolether : Essigsäureethylester = 1:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +3.00$  (c = 1.02, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 8.18 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, H - 4), 7.75 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, H - 7), 7.57 (d, J = 8.9 Hz, 1 H, H - 3), 7.55 – 7.34 (m, 11 H, H - 8, -OBn), 6.91 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, H - 9), 5.27 (s, 2 H, -OBn), 5.12 (d, J = 11.3 Hz, 1 H, -OBn), 5.06 (d, J = 11.6 Hz, 1 H, -OBn), 4.95 (dd, J = 11.6 und 2.0 Hz, 1 H, H - 1'),

3.69 (ddd,  $J = 11.2, 8.6$  und  $4.9$  Hz, 1 H, H - 3'), 3.38 (dq,  $J = 9.2$  und  $6.2$  Hz, 1 H, H - 5'), 4.87 (t,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, H - 4'), 2.07 (ddd,  $J = 12.8, 4.9$  und  $2.0$  Hz, 1 H, H - 2'\_{aq}), 1.83 (ddd,  $J = 12.8, 11.6$  und  $11.2$  Hz, 1 H, H - 2'\_{ax}), 1.35 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H, H - 6') ppm.

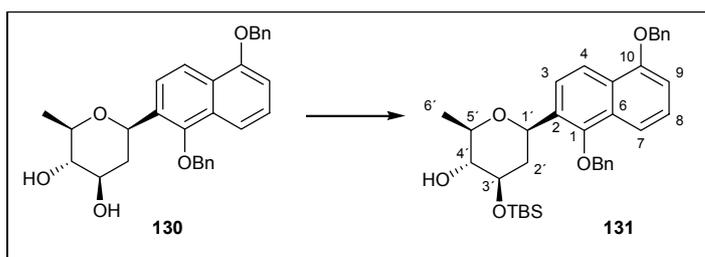
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 154.9$  ( $\text{C}_q$ , C - 10), 151.2 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 137.4 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 137.0 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 130.5 ( $\text{C}_q$ , C - 6), 129.1 ( $\text{C}_q$ , C - 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 128.2 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 127.0 ( $\text{C}_q$ , C - 2), 126.2 (CH, C - 8), 123.5 (CH, C - 3), 119.1 (CH, C - 4), 114.8 (CH, C - 7), 105.8 (CH, C - 9), 78.1 (CH, C - 4'), 77.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 75.9 (CH, C - 5'), 73.5 (CH, C - 3'), 72.0 (CH, C - 1'), 70.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 40.0 ( $\text{CH}_2$ , C - 2'), 18.1 ( $\text{CH}_3$ , C - 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{O}_5$ : 471.2171, gefunden: 471.2170.

Sonnengelber Schaum,  $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_5$  MG = 470.568 g/mol.

### 9.20.5 Selektive Silylierung des Glycosids **130** an Position 3'

1-(1,10-bis(benzyloxy)naphthalin)-3-O-tertbutyl-dimethylsilyl- $\beta$ -D-arabino- tetrahydro-pyran (**131**)



Unter Ausschluss von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden 170 mg (0.61 mmol) des Glycosids **130** in DMF gelöst. Unter Eiskühlung werden 70  $\mu\text{L}$  (64 mg, 0.60 mmol) 2,6-Lutidin zu getropft. Nach 5 Minuten werden 95  $\mu\text{L}$  (109 mg, 0.41 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyl-trifluormethansulfonat langsam zu getropft. Anschließend wird 2 Std. bei RT gerührt. Danach werden weitere 22  $\mu\text{L}$  (20 mg, 0.19 mmol) 2,6-Lutidin und im Anschluss 43  $\mu\text{L}$  (49 mg, 0.19 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltrifluormethansulfonat zu getropft. Es wird wiederum 1 Std. bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc $\rightarrow$  Cyc / EE 15:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 192 mg (0.33 mmol) = 91 %.

**Rf:** 0.64 (Petrolether : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15.2$  ( $c = 0.99$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

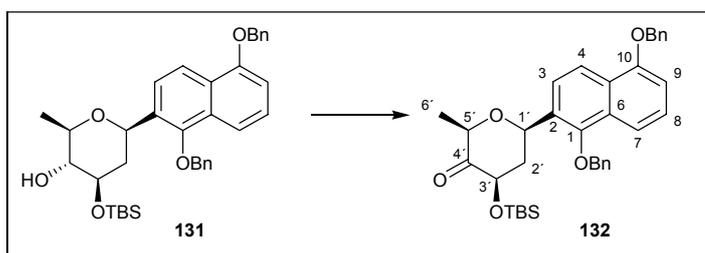
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.19$  (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H – 4), 7.75 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 7), 7.61 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H – 3), 7.55 – 7.36 (m, 11 H, H – 8, -OBn), 6.90 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1 H, H – 9), 5.27 (s, 2 H, -OBn), 5.15 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1 H, -OBn), 5.03 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1 H, -OBn), 4.96 (dd,  $J = 11.4$  und 2.0 Hz, 1 H, H – 1'), 3.71 (ddd,  $J = 11.0$ , 8.4 und 4.9 Hz, 1 H, H – 3'), 3.44 (dq,  $J = 9.2$  und 6.2 Hz, 1 H, H – 5'), 3.22 (t,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H – 4'), 2.32 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1 H, -OH), 2.09 (ddd,  $J = 12.9$ , 4.9 und 2.1 Hz, 1 H, H – 2'\_{\text{äq}}), 1.86 (ddd,  $J = 12.9$ , 11.4 und 11.4 Hz, 1 H, H – 2'\_{\text{ax}}), 1.37 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3 H, H – 6'), 0.87 (s, 9 H, -OTBS), 0.11 (s, 3 H, -OTBS), 0.05 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 154.9$  ( $\text{C}_q$ , C – 10), 151.1 ( $\text{C}_q$ , C – 1), 137.4 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 137.0 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 130.7 ( $\text{C}_q$ , C – 6), 129.1 ( $\text{C}_q$ , C – 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 128.2 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 126.9 ( $\text{C}_q$ , C – 2), 126.2 (CH, C – 8), 123.6 (CH, C – 3), 119.1 (CH, C – 4), 114.8 (CH, C – 7), 105.7 (CH, C – 9), 77.9 (CH, C – 4'), 77.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 75.7 (CH, C – 5'), 74.8 (CH, C – 3'), 72.0 (CH, C – 1'), 70.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 40.8 ( $\text{CH}_2$  C – 2'), 25.7 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), 18.3 ( $\text{C}_q$ , -OTBS), 18.0 ( $\text{CH}_3$ , C – 6'), -4.1 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), -4.6 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS) ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H) $^+$  berechnet für  $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{O}_5\text{Si}$ : 585.3036, gefunden: 585.3040.

Gelber Schaum,  $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Si}$ , MG = 584.82 g/mol.

## 9.20.6 Oxidation des Alkohols 131 an C 4' zum Keton 132



Unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff werden 50 mg (0.086 mmol) des Glycosids **131** in Dichlormethan gelöst. Bei 0°C werden 91 mg (0.215 mmol) DMP zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur 12 Std. gerührt. Im Anschluss werden 4 mL Natriumthiosulfatlösung zugegeben und 30 min kräftig gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird 3-mal mit 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc → Cyc/EE 15:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 40 mg (0.069 mmol) = 81 %.

**Rf:** 0.65 (Petrolether : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +11.4$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 8.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 4), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 7), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H – 3), 7.55 – 7.36 (m, 11 H, H - 8, -OBn), 6.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H – 9), 5.30 (dd, *J* = 11.4 und 1.9 Hz, 1 H, H – 1'), 5.29 (s, 2 H, -OBn), 5.22 (d, *J* = 11.6 Hz, 1 H, -OBn), 5.10 (d, *J* = 11.4 Hz, 1 H, -OBn), 3.71 (ddd, *J* = 11.9, 7.1 und 1.1 Hz, 1 H, H – 3'), 3.98 (dq, *J* = 6.3 und 1.2 Hz, 1 H, H - 5'), 2.09 (ddd, *J* = 13.1, 7.1 und 2.0 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 2.35 (ddd, *J* = 12.7, 12.0 und 12.0 Hz, 1 H, H – 2'\_{eq}), 1.34 (d, *J* = 6,0 Hz, 3 H, H – 6'), 0.89 (s, 9 H, -OTBS), 0.16 (s, 3 H, -OTBS), 0.05 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

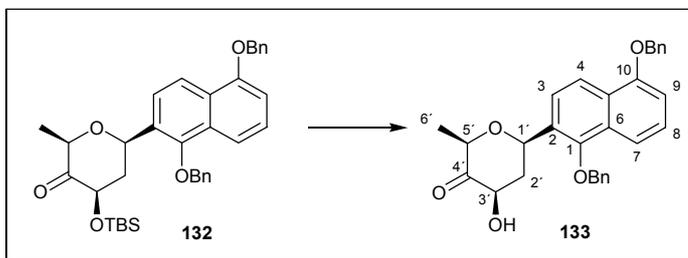
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 205.7 (C<sub>q</sub>, C – 4'), 154.9 (C<sub>q</sub>, C - 10), 151.2 (C<sub>q</sub>, C – 1), 137.5 (C<sub>q</sub>, -OBn), 137.0 (C<sub>q</sub>, -OBn), 129.6 (C<sub>q</sub>, C – 6), 129.0 (C<sub>q</sub>, C – 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 128.3 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 127.1 (C<sub>q</sub>, C - 2), 126.3 (CH, C – 8), 123.2 (CH, C – 3), 119.3 (CH, C – 4), 114.8 (CH, C – 7), 105.8 (CH, C – 9), 77.9 (CH, C – 5'), 77.1

(CH<sub>2</sub>, -OBn), 74.6 (CH, C – 3'), 72.0 (CH, C – 1'), 70.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 44.8 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 25.7 (CH<sub>3</sub>, -OTBS), 18.4 (C<sub>q</sub>, -OTBS), 14.5 (CH<sub>3</sub>, C – 6'), -4.6 (CH<sub>3</sub>, -OTBS), -5.4 (CH<sub>3</sub>, -OTBS) ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>O<sub>5</sub>Si, 583.2880, gefunden: 583.2883

Hellgelber Schaum, C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>Si, MG = 582.80 g/mol;

### 9.20.7 Desilylierung des Glycosids **132** zum Alkohol **133**



20 mg des Glycosids **132** werden in 5 mL THF gelöst. Im Anschluss werden 200 µL HF Pyridin dazu gegen. Die Reaktionsmischung wird über 48 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit Phosphatpuffer (pH 7.0) versetzt und mit 4-mal 10 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc/EE=5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 40 mg (0.069 mmol) = 81 %.

**Rf:** 0.40 (Petrolether : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +25.7$  (c = 1.03, CHCl<sub>3</sub>).

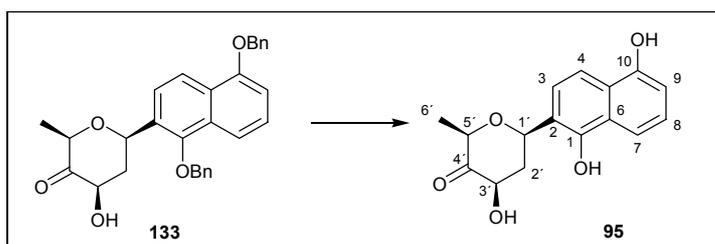
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.20$  (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 4), 7.77 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 7), 7.51 – 7.36 (m, 12 H, H – 3, H – 8, -OBn), 6.93 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 9), 5.33 (dd,  $J = 11.6$  und 1.7 Hz, 1 H, H – 1'), 5.28 (s, 2 H, -OBn), 5.21 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 5.12 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 4.35 (dd,  $J = 11.9, 7.2$  Hz, 1 H, H – 3'), 4.05 (dq,  $J = 6.5$  und 1.4 Hz, 1 H, H – 5'), 3.56 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1 H, 3'-OH) 2.58 (ddd,  $J = 12.8, 7.2$  und 1.7 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.35 (ddd,  $J = 12.8, 11.6$  und 11.6 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.36 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 207.6$  ( $\text{C}_q$ , C – 4'), 154.9 ( $\text{C}_q$ , C – 10), 151.2 ( $\text{C}_q$ , C – 1), 137.4 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 136.9 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 129.2 ( $\text{C}_q$ , C – 6), 129.0 ( $\text{C}_q$ , C – 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, OBn), 128.3 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 127.2 ( $\text{C}_q$ , C – 2), 126.4 (CH, C – 8), 123.1 (CH, C – 3), 119.3 (CH, C – 4), 114.9 (CH, C – 7), 105.9 (CH, C – 9), 77.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 77.1 (CH, C – 5'), 73.2 (CH, C – 3'), 71.7 (CH, C – 1'), 70.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 44.1 ( $\text{CH}_2$  C – 2'), 14.3 ( $\text{CH}_3$ , C – 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{O}_5$ : 469.2015, gefunden: 469.2018.

Gelber Schaum,  $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{O}_5$ , MG = 468.54 g/mol.

### 9.20.8 Finale Entschützung zum Produkt 95



822 mg (1.754 mmol) des Glycosids **133** werden in 30 mL Essigsäureethylester gelöst. Im Anschluss werden bei 0°C unter Ausschluss von Sauerstoff 320 mg Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.

Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE=7:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 287 mg (0.996 mmol) = 57 %.

**Rf:** 0.40 (Petrolether : Essigsäureethylester = 1:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +17.8$  ( $c = 0.99$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm):  $\delta = 7.75$  (d,  $J = 9.2$  Hz, 1 H, H – 4), 7.67 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 7), 7.34 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 3), 7.26 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 8), 6.81 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1 H, H – 9), 5.55 (dd,  $J = 11.4$  und 1.9 Hz, 1 H, H – 1'), 4.62 (dd,  $J = 12.1$ , 7.0 Hz, 1 H, H – 3'), 4.37 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, H – 5'), 2.75 (ddd,  $J = 12.7$ , 6.5 und 1.9 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.13 (ddd,  $J = 12.7$ , 12.0 und 12.0 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.36 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz, MeOD, MeOH = 49.0 ppm):  $\delta = 208.2$  ( $\text{C}_q$ , C – 4'), 154.5 ( $\text{C}_q$ , C – 10), 150.0 ( $\text{C}_q$ , C – 1), 128.2 ( $\text{C}_q$ , C – 6), 127.0 ( $\text{C}_q$ , C – 5), 126.5 (CH, C – 8), 123.5 (CH, C – 3), 122.0 ( $\text{C}_q$ , C – 2), 115.4 (CH, C – 4), 113.9 (CH, C – 7), 109.3 (CH, C – 9), 78.5 (CH, C – 5'), 75.4 (CH, C – 3'), 74.1 (CH, C – 1'), 45.4 ( $\text{CH}_2$  C – 2'), 14.6 ( $\text{CH}_3$ , C – 6') ppm.

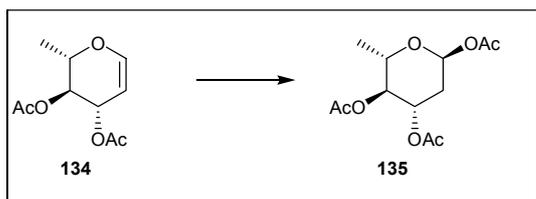
**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_5$ : 287.0919, gefunden: 287.0919.

Gelbes Öl,  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ , MG = 288.30 g/mol.

## 9.21 Versuche zu Kapitel 7.5

### 9.21.1 Darstellung des Acylglycosids 135

Acetyl 1,5-Anhydro-3,4-di-O-acetyl-2,6-dideoxy- $\alpha$ -L-arabino-pyranose (**135**)

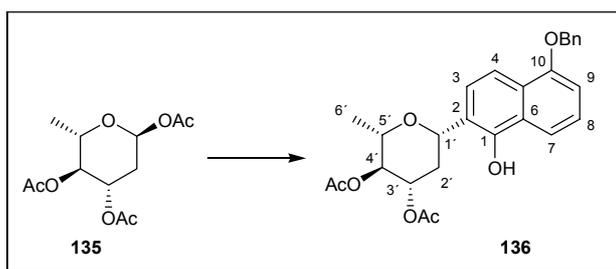


Zu einer Lösung von 3.00 g (14.0 mmol) **134** in 100 mL Dichlormethan werden 1.6 mL (28.0 mmol) Eisessig, 1.3 mL (14.0 mmol) Acetanhydrid getropft. Unter Eiskühlung werden 1.20 mg (3.5 mmol)  $\text{PPh}_3\text{HBr}$  über 30 min. in drei Portionen zur Reaktionsmischung gegeben und anschließend 5 Std. bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert (3 x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan) aufgereinigt. Die Ausbeute beträgt 2.493 g (9.12 mmol) = 67%

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen von **119** überein.

### 9.21.2 Kupplung mit 1,5-Dihydroxynaphthalinderivat

1-(10-(Benzyloxy)-naphthalin-1-ol)-3,4-di-O-acetyl- $\beta$ -L-arabino-tetrahydro-pyran (**136**)



Unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff werden 1000 mg (3.646 mmol) des Acylglycosids **135** und 1,82 g des Aromaten (7.29 mmol) in absolutem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung werden 200 mg Molsieb (5 Å) gegeben. Bei  $-30^\circ\text{C}$  werden 922  $\mu\text{L}$  (1040 mg, 7.29 mmol) Bortrifluoretherat (verdünnt auf 3 mL mit abs. Dichlormethan), tropfen weise über 3 Std. zu der Reaktionslösung gegeben. Während der Zugabe wird die Lösung tief rot. Nach Beendigung der Zugabe wird die Reaktionslösung langsam über 10 Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsmischung wird weitere 12 Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Mischung mit Wasser hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Flashchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester = 20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 945 mg (2.034 mmol) = 56%.

**Rf:** 0.28 (Cyclohexan : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +19.7$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):  $\delta$  = 8.44 (s, 1 H, -OH), 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H - 4), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H - 7), 7.52 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H, H - 8), 7.44 – 7.36 (m, 5 H, -OBn), 7.01 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H - 3), 6.90 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H, H - 9), 5.22 (s, 2 H, -OBn), 5.17 (ddd, *J* = 11.4, 9.6 und 5.2 Hz, 1 H, H - 3'), 4.98 (t, *J* = 9.6 Hz, 1 H, H - 4'), 4.91 (dd, *J* = 11.7 und 2.3 Hz, 1 H, H - 1'), 3.75 (dq, *J* = 9.6 und 6.3 Hz, 1 H, H - 5'), 2.47 (ddd, *J* = 12.8, 5.2 und 2.3 Hz, 1 H, H - 2'\_{äq}), 2.13 (s, 3 H, -OAc), 2.10 (ddd, *J* = 12.8, 11.7 und 11.7 Hz, 1 H, H - 2'\_{ax}), 2.03 (s, 3 H, -OAc), 1.38 (d, *J* = 6.3 Hz, 3 H, H - 6') ppm.

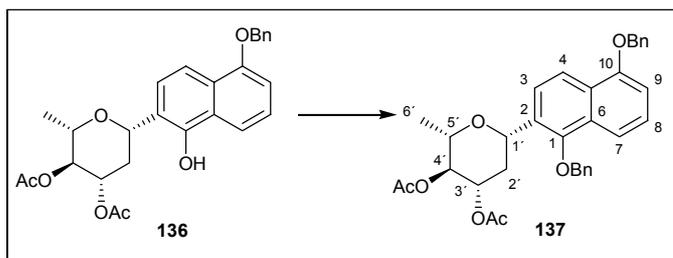
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm):  $\delta$  = 170.4 (C<sub>q</sub>, -OAc), 170.0 (C<sub>q</sub>, -OAc), 154.1 (C<sub>q</sub>, C - 10), 150.5 (C<sub>q</sub>, C - 1), 137.1 (C<sub>q</sub>, -OBn), 128.4 (CH, -OBn), 128.5 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 127.2 (CH, -OBn), 126.6 (C<sub>q</sub>, C - 5), 126.3 (C<sub>q</sub>, C - 6), 125.3 (CH, C - 8), 123.4 (CH, C - 3), 117.2 (C<sub>q</sub>, C - 2), 114.6 (CH, C - 4), 113.9 (CH, C - 7), 105.9 (CH, C - 9), 79.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 75.1 (CH, C - 4'), 73.9 (CH, C - 3'), 71.6 (CH, C - 5'), 70.0 (CH, C - 1'), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C - 2'), 20.9 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 20.8 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 18.0 (CH<sub>3</sub>, C - 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M - H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>: 463.1757, gefunden: 463.1765.

Sonnengelber Schaum ; C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub> MG = 464.51 g/mol.

### 9.21.3 Benzylierung des Glycosids

1-(1,10-Bis(benzyloxy)naphthalin)-3,4-di-O-acetyl- $\beta$ -L-arabino-tetrahydro-pyran (**137**)



Unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff werden 945 mg (2.034 mmol) des Glycosids **136** in 50 mL THF gelöst. Im Anschluss werden 749 mg (2.034 mmol) Tetrabutylammoniumiodid und 10 mL Benzylbromid hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 0°C gekühlt und nach 30 Minuten werden 941 mg (4.07 mmol) Silberoxid hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2.5 h bei 0°C stark gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Silberoxid über Kieselgel abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc → Cyc/EE=10:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 1.03 g (1.85 mmol) = 91 %.

**Rf:** 0.27 (Cyclohexan : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +22.1$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.21$ (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 4), 7.76 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 7), 7.54(d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 3), 7.52 – 7.35 (m, 11 H, H – 8, -OBn), 6.94 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 9), 5.29 (s, 2 H, -OBn), 5.16 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1 H, -OBn), 5.11 (ddd,  $J = 9.5, 6.2$  und  $5.2$  Hz, 1 H, H – 3'), 5.08 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1 H, -OBn), 4.97 (dd,  $J = 11.6$  und  $2.0$  Hz, 1 H, H – 1'), 4.88 (t,  $J = 9.4$  Hz, 1 H, H – 4'), 3.54 (dq,  $J = 9.5$  und  $6.1$  Hz, 1 H, H – 5'), 2.22 (ddd,  $J = 12.8, 5.2$  und  $2.0$  Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.10 (s, 3 H, -OAc), 2.04 (s, 3 H, -OAc), 1.96 (ddd,  $J = 12.8, 11.7$  und  $11.5$  Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.25 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

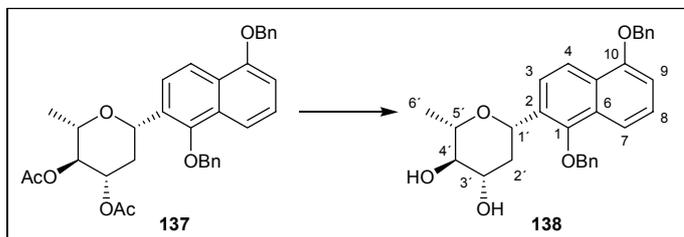
**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 170.3$  ( $\text{C}_q$ , -OAc), 170.2 ( $\text{C}_q$ , -OAc), 154.9 ( $\text{C}_q$ , C – 10), 151.2 ( $\text{C}_q$ , C – 1), 137.2 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 137.0 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 129.8 ( $\text{C}_q$ , C – 6), 129.0 ( $\text{C}_q$ , C – 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 128.3 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 127.1 (CH, -OBn), 127.0 (CH, C – 8), 126.2 (CH, C – 3), 123.3 (CH, C – 4), 119.1 ( $\text{C}_q$ , C – 2), 115.0 (CH, C – 7), 105.8 (CH, C – 9), 77.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 74.7 (CH, C – 5'), 74.4 (CH, C – 4'), 72.3 (CH, C – 3'), 71.8 (CH, C – 1'), 70.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 37.4 ( $\text{CH}_2$ , C – 2'), 21.0 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 20.9 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 18.0 ( $\text{CH}_3$ , C – 6') ppm.

**EI-MS:** ( $\text{M}^+$ ) berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_7$ : 554.2305, gefunden: 554.2310.

Gelbes Öl,  $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_7$ , MG = 554.63 g/mol.

### 9.21.4 Entschützung des Glycosids

1-(1,10-bis(benzyloxy)naphthalin)- $\beta$ -L-*arabino*-hexopyranosid (**138**)



925 mg (1.668 mmol) des Glycosids **137** werden in 15 mL Dichlormethan gelöst. Im Anschluss werden 15 mL Methanol und 20 mg (0.333 mmol) Natriummethanolat hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit 50 mL Phosphatpuffer (pH 7.0) versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester=20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 785 mg (1.651 mmol) = 99%.

**Rf:** 0.15 (Petrolether : Essigsäureethylester = 1:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -3.0$  ( $c = 1.01$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm):  $\delta = 8.08$  (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 4), 7.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 7), 7.58 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 3), 7.55 – 7.33 (m, 11 H, H - 8, -OBn), 6.98 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 9), 5.24 (s, 2 H, -OBn), 5.08 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 5.02 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 4.90 (dd,  $J = 11.6$  und 2.0 Hz, 1 H, H – 1'), 3.55 (ddd,  $J = 11.4$ , 8.6 und 4.9 Hz, 1 H, H – 3'), 3.28 (dq,  $J = 9.3$  und 6.2 Hz, 1 H, H - 5'), 4.87 (t,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, H – 4'), 2.02 (ddd,  $J = 12.8$ , 4.9 und 2.0 Hz, 1 H, H – 2'\_{\text{äq}}), 1.75 (ddd,  $J = 12.8$ , 11.6 und 11.4 Hz, 1 H, H – 2'\_{\text{ax}}), 1.29 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, H – 6')

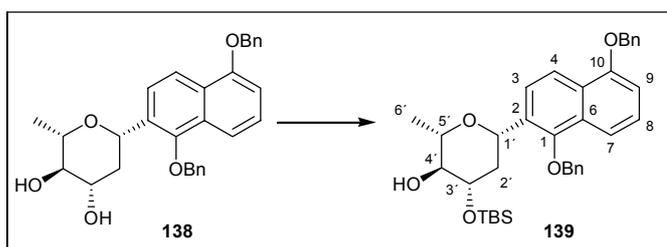
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, MeOD, MeOH = 49.0 ppm):  $\delta$  = 156.1 ( $\text{C}_q$ , C – 10), 152.5 ( $\text{C}_q$ , C – 1), 138.8 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 138.6 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 132.1 ( $\text{C}_q$ , C – 6), 130.4 ( $\text{C}_q$ , C – 5), 129.7 (CH, -OBn), 129.6 (CH, -OBn), 129.3 (CH, -OBn), 129.1 (CH, -OBn), 128.9 (CH, -OBn), 128.5 (CH, -OBn), 128.2 ( $\text{C}_q$ , C – 2), 127.4 (CH, C – 8), 124.7 (CH, C – 3), 119.6 (CH, C – 4), 115.8 (CH, C – 7), 107.0 (CH, C – 9), 78.8 (CH, C – 4'), 78.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 77.8 (CH, C – 5'), 74.0 (CH, C – 3'), 73.5 (CH, C – 1'), 71.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 41.5 ( $\text{CH}_2$ , C – 2'), 18.6 ( $\text{CH}_3$ , C – 6')ppm.

**HRMS (ESI):** ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup> berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{O}_5$ : 471.2171, gefunden: 471.2174.

Sonnengelber Schaum,  $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_5$ , MG = 470.56 g/mol.

### 9.21.5 Selektive Silylierung des Glycosids **138** an Position 3'

1-(1,10-bis(benzyloxy)naphthalin)-3-O-tertbutyldimethylsilyl- $\beta$ -L-arabino-tetrahydro-pyran (**139**)



Unter Ausschluss von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden 741 mg (1.575 mmol) des Glycosids **138** in DMF gelöst. Unter Eiskühlung werden 275  $\mu\text{L}$  (253 mg, 2.363 mmol) 2,6-Lutidin zu getropft. Nach 5 Minuten werden 365  $\mu\text{L}$  (421 mg, 1.591 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltrifluoromethansulfonat langsam zu getropft. Anschließend wird 2.5 Std. bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionsmischung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc  $\rightarrow$  Cyc/EE = 15:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 740 mg (1.265 mmol) = 80 %.

**Rf:** 0.64 (Petrolether : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +15.1$  ( $c = 0.99$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

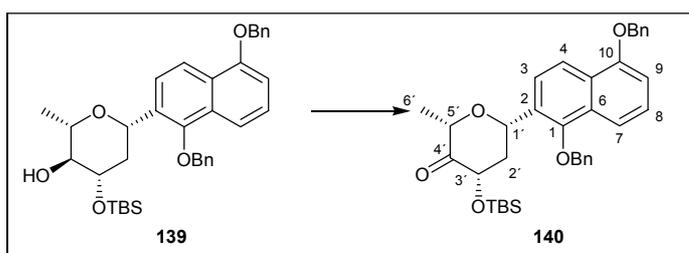
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.20$  (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H - 4), 7.75 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H - 7), 7.61 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H - 3), 7.62 – 7.36 (m, 11 H, H - 8, -OBn), 6.91 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H - 9), 5.27 (s, 2 H, -OBn), 5.15 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1 H, -OBn), 5.04 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1 H, -OBn), 4.97 (dd,  $J = 11.6$  und 2.1 Hz, 1 H, H - 1'), 3.72 (ddd,  $J = 11.0$ , 8.8 und 4.9 Hz, 1 H, H - 3'), 3.44 (dq,  $J = 8.8$  und 6.1 Hz, 1 H, H - 5'), 3.23 (t,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H - 4'), 2.32 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1 H, -OH), 2.09 (ddd,  $J = 12.8$ , 4.9 und 2.1 Hz, 1 H, H - 2'\_{\text{äq}}), 1.86 (ddd,  $J = 12.8$ , 11.6 und 11.0 Hz, 1 H, H - 2'\_{\text{ax}}), 1.38 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3 H, H - 6'), 0.89 (s, 9 H, -OTBS), 0.11 (s, 3 H, -OTBS), 0.06 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 154.9$  ( $\text{C}_q$ , C - 10), 151.2 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 137.5 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 137.1 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 130.8 ( $\text{C}_q$ , C - 6), 129.1 ( $\text{C}_q$ , C - 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 128.2 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 126.9 ( $\text{C}_q$ , C - 2), 126.2 (CH, C - 8), 123.6 (CH, C - 3), 119.1 (CH, C - 4), 114.8 (CH, C - 7), 105.7 (CH, C - 9), 77.9 (CH, C - 4'), 77.0 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 75.6 (CH, C - 5'), 74.8 (CH, C - 3'), 72.0 (CH, C - 1'), 70.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 40.9 ( $\text{CH}_2$ , C - 2'), 25.7 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), 18.3 ( $\text{C}_q$ , -OTBS), 18.0 ( $\text{CH}_3$ , C - 6'), -4.1 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), -4.6 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS) ppm.

**HRMS (ESI):**  $(\text{M}+\text{H})^+$  berechnet für  $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{O}_5\text{Si}$ : 585.3036, gefunden: 585.3029.

Gelber Schaum,  $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Si}$ , MG = 584.82 g/mol.

### 9.21.6 Oxidation des Alkohols 139 an C 4' zum Keton 140



Unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff werden 720 mg (1.231 mmol) des Glycosids **139** in Dichlormethan gelöst. Bei 0°C werden 1306 mg (3.078 mmol) DMP zu gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur 12 Std. gerührt. Im Anschluss werden 25 mL Natriumthiosulfatlösung zugegeben und 30 min kräftig gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird 3-mal mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc → Cyc / EE = 15:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 681 mg (1.169 mmol) = 95 %.

**Rf:** 0.65 (Petrolether : Essigsäureethylester = 3:1).

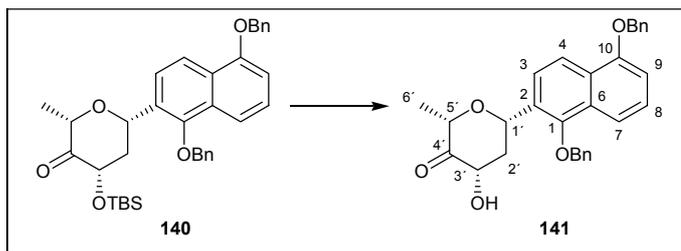
**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -11.3$  ( $c = 0.99$ , CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):  $\delta = 8.20$  (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 4), 7.76 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 7), 7.55 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H – 3), 7.54 – 7.36 (m, 11 H, H – 8, -OBn), 6.93 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1 H, H – 9), 5.30 (dd,  $J = 11.4$  und 1.9 Hz, 1 H, H – 1'), 5.27 (s, 2 H, -OBn), 5.23 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1 H, -OBn), 5.11 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1 H, -OBn), 4.37 (dd,  $J = 11.7, 7.0$  Hz, 1 H, H – 3'), 3.98 (q,  $J = 6.4$  Hz, 1 H, H – 5'), 2.50 (ddd,  $J = 12.9, 7.0$  und 2.9 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.36 (ddd,  $J = 12.9, 11.7$  und 11.4 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.34 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3 H, H – 6'), 0.91 (s, 9 H, -OTBS), 0.17 (s, 3 H, -OTBS), 0.06 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm):  $\delta = 205.7$  (C<sub>q</sub>, C – 4'), 154.9 (C<sub>q</sub>, C – 10), 151.2 (C<sub>q</sub>, C – 1), 137.5 (C<sub>q</sub>, -OBn), 137.0 (C<sub>q</sub>, -OBn), 129.6 (C<sub>q</sub>, C – 6), 129.0 (C<sub>q</sub>, C – 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 128.3 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 127.1 (C<sub>q</sub>, C – 2), 126.3 (CH, C – 8), 123.2 (CH, C – 3), 119.3 (CH, C – 4), 114.8 (CH, C – 7), 105.8 (CH, C – 9), 77.9 (CH, C – 5'), 77.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 74.6 (CH, C – 3'), 72.0 (CH, C – 1'), 70.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 44.8 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 25.7 (CH<sub>3</sub>, -OTBS), 18.4 (C<sub>q</sub>, -OTBS), 14.5 (CH<sub>3</sub>, C – 6'), -4.6 (CH<sub>3</sub>, -OTBS), -5.4 (CH<sub>3</sub>, -OTBS) ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>O<sub>5</sub>Si, 583.2880, gefunden: 583.2888.

Hellgelber Schaum, C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>Si, MG = 582.80 g/mol.

9.21.7 Desilylierung des Glycosids **140** zum Alkohol **141**

661 mg (1.134 mmol) des Glycosids **140** werden in 15 mL THF gelöst. Im Anschluss werden 4 mL HF·Pyridin dazu geben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert und mit 4 mal 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Phosphatpuffer (pH 7.0) gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc/EE = 5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 345 mg (0.739 mmol) = 65 %.

**Rf:** 0.40 (Petrolether : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -25.6$  (c = 1.01, CHCl<sub>3</sub>).

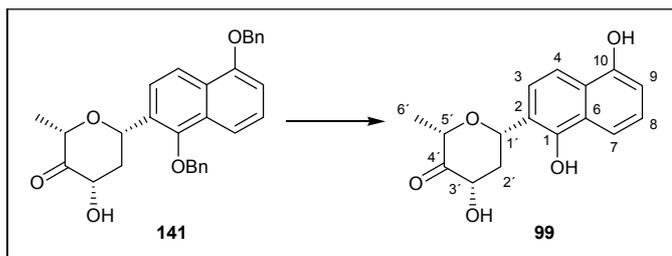
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 8.20 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H – 4), 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 7), 7.51 – 7.36 (m, 12 H, H – 3, H – 8, -OBn), 6.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H – 9), 5.33 (dd, *J* = 11.6 und 1.7 Hz, 1 H, H – 1'), 5.28 (s, 2 H, -OBn), 5.21 (d, *J* = 11.6 Hz, 1 H, -OBn), 5.13 (d, *J* = 11.6 Hz, 1 H, -OBn), 4.35 (dd, *J* = 11.9, 7.2 Hz, 1 H, H – 3'), 4.05 (q, *J* = 6.5 Hz, 1 H, H – 5'), 3.56 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, -OH) 2.58 (ddd, *J* = 12.8, 7.2 und 1.7 Hz, 1 H, H – 2'\_{äq}), 2.21 (ddd, *J* = 12.8, 11.6 und 11.6 Hz, 1 H, H - 2'\_{ax}), 1.36 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, H – 6') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 207.6 (C<sub>q</sub>, C – 4'), 154.9 (C<sub>q</sub>, C – 10), 151.3 (C<sub>q</sub>, C – 1), 137.4 (C<sub>q</sub>, -OBn), 136.9 (C<sub>q</sub>, -OBn), 129.2 (C<sub>q</sub>, C – 6), 129.0 (C<sub>q</sub>, C – 5), 128.7 (CH, -OBn), 128.6 (CH, -OBn), 128.3 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.3 (CH, -OBn), 127.2 (C<sub>q</sub>, C - 2), 126.4 (CH, C – 8), 123.1 (CH, C – 3), 119.3 (CH, C – 4), 114.9 (CH, C – 7), 105.9 (CH, C – 9), 77.3 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 77.1 (CH, C - 5'), 73.2 (CH, C – 3'), 71.7 (CH, C – 1'), 70.2 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 44.1 (CH<sub>2</sub> C – 2'), 14.2 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub>: 469.2015, gefunden: 469.2017.

Gelber Schaum, C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>, MG = 468.54 g/mol.

### 9.21.8 Finale Entschützung zum Produkt 99



325 mg (0.694 mmol) des Glycosids **141** werden in 20 mL Essigsäureethylester gelöst. Im Anschluss werden bei 0°C unter Ausschluss von Sauerstoff 120 mg Palladium auf Aktivkohle (10% Pd) hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 100 mg (0.347 mmol) = 54 %.

**Rf:** 0.40 (Petrolether : Essigsäureethylester = 1:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +17.9$  (c = 1.02, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm):  $\delta$  = 7.75 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, H – 4), 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 7), 7.34 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H – 3), 7.26 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 8), 6.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H – 9), 5.55 (dd, *J* = 11.4 und 1.9 Hz, 1 H, H – 1'), 4.62 (dd, *J* = 12.1, 7.0 Hz, 1 H, H – 3'), 4.37 (q, *J* = 6.5 Hz, 1 H, H – 5'), 2.75 (ddd, *J* = 12.7, 6.5 und 1.9 Hz, 1 H, H – 2'<sub>aq</sub>), 2.13 (ddd, *J* = 12.7, 12.0 und 12.0 Hz, 1 H, H – 2'<sub>ax</sub>), 1.36 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, H – 6') ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz, MeOD, MeOH = 49.0 ppm):  $\delta$  = 208.2 (Cq, C - 4'), 154.5 (Cq, C - 10), 150.0 (Cq, C - 1), 128.2 (Cq, C - 6), 127.0 (Cq, C - 5), 126.5 (CH, C - 8), 123.5 (CH, C - 3), 122.0 (Cq, C - 2), 115.4 (CH, C - 4), 113.9 (CH, C - 7), 109.3 (CH, C - 9), 78.5 (CH, C - 5'), 75.4 (CH, C - 3'), 74.1 (CH, C - 1'), 45.4 (CH<sub>2</sub> C - 2'), 14.6 (CH<sub>3</sub>, C - 6') ppm.

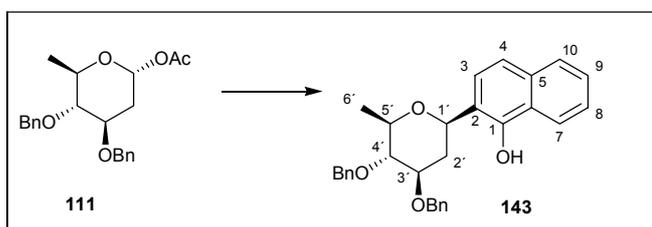
**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>: 287.0919, gefunden: 287.0917.

Farbloses Öl, C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, MG = 288.30 g/mol.

## 9.22 Versuche zu Kapitel 7.6

### 9.22.1 C – Glycosylierung mit dem Glycosylacetat **111**

1-(1-Naphthol)-3,4-di-O-benzyl- $\beta$ -D-*arabino*- tetrahydro-pyran (**143**)



Unter Eiskühlung werden zu einer Lösung aus 51 mg (0.138 mmol) Acylglycosids **111** und 22 mg (0.138 mmol) 1,5-Dihydroxynaphthalin in 2 mL Acetonitril 21  $\mu\text{L}$  (24 mg, 0.165 mmol) Bortrifluoretherat langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird 60 min. bei RT gerührt und dann mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc/EE/MeOH = 15:0.5:0.5) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 37 mg (0.077 mmol) = 55 %.

**Rf:** 0.12 (Petrolether : Essigsäureethylester = 50:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.89$  (s, 1 H, -OH), 8.42 – 8.40 (m, 1 H, H – 7), 7.86 - 7.82 (m, 1 H, H – 10), 7.59 – 7.54 (m, 2 H, H – 3, H – 8) 7.47 – 7.35 (m, 11 H, H – 4, -OBn), 7.12 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 9), 5.10 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1 H, -OBn), 4.86 (dd,  $J = 11.9$  und  $2.1$  Hz, 1 H, H – 1'), 4.80 (d,  $J = 10.9$  Hz, 2 H, -OBn), 4.71 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1 H, -OBn), 3.90 (ddd,  $J = 11.3, 9.0$  und  $4.9$  Hz, 1 H, H – 3'), 3.69 (dq,  $J = 9.0$  und  $6.2$  Hz, 1 H, H – 5'), 3.39 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1 H, H – 4'), 2.57 (ddd,  $J = 13.3, 4.9$  und  $2.1$  Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.11 (ddd,  $J = 13.3, 11.9$  und  $11.3$  Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.56 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

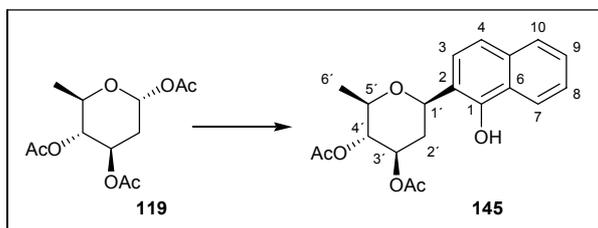
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 150.8$  ( $\text{C}_q$ , C – 1), 138.3 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 138.2 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 133.8 ( $\text{C}_q$ , C – 5), 128.4 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.6 (CH, C – 10), 127.5 (CH, -OBn), 127.2 (CH, -OBn), 126.3 (CH, C – 8), 125.5 ( $\text{C}_q$ , C – 2), 125.2 (CH, C – 9), 124.2 (CH, C – 3), 122.1 (CH, C – 7), 119.2 (CH, C – 4), 117.3 ( $\text{C}_q$ , C – 6), 83.4 (CH, C – 4'), 80.2 (CH, C – 5'), 79.2 (CH, C – 3'), 76.4 (CH, C – 1'), 75.4 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 71.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 37.7 ( $\text{CH}_2$  C – 2'), 18.6 ( $\text{CH}_3$ , C – 6') ppm.

**HRMS (ESI):** ( $\text{M} - \text{H}$ ) $^-$  berechnet für  $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{O}_4$ : 453.2079 gefunden: 453.2066.

Gelbliches Öl,  $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_4$ , MG = 454.21 g/mol.

### 9.22.2 Kupplung von **119** mit Naphtholderivat

1-(1-Naphthol)-3,4-di-O-acetyl- $\beta$ -D-arabino- tetrahydro-pyran (**145**)



Unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff werden 500 mg (1.823 mmol) des Acylglycosids **119** und 526 mg des Aromaten (3.646 mmol) in absolutem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung werden 100 mg Molsieb (5 Å) gegeben. Bei  $-30^\circ\text{C}$  werden 459  $\mu\text{L}$  (518 mg, 3.646 mmol) Bortrifluoretherat (verdünnt auf 1500  $\mu\text{L}$  mit abs. Dichlormethan), tropfen weise zu der Reaktionslösung gegeben. Während der Zugabe wird die Lösung tief gelb. Nach Beendigung der Zugabe wird die Reaktionslösung langsam über 10 Stunden

auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsmischung wird weitere 12 Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Mischung mit Wasser hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3x 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Flashchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester = 20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 285 mg (0.795 mmol) = 44%.

**Rf:** 0.29 (Cyclohexan : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -44.0$  (c = 0.99, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub> DMSO, DMSO = 2.50 ppm):  $\delta = 9.38$  (s, 1 H, OH), 8.23 – 8.21 (m, 1 H, H – 7), 7.82 - 7.80 (m, 1 H, H – 10), 7.49 – 7.41 (m, 4 H, H – 3, H – 4, H – 8, H – 9), 5.17 (dd,  $J = 11.6$  und  $2.2$  Hz, 1 H, H – 1'), 5.15 (ddd,  $J = 11.5, 9.7$  und  $5.4$  Hz, 1 H, H – 3'), 4.76 (t,  $J = 9.7$  Hz, 1 H, H – 4'), 3.76 (dq,  $J = 9.7$  und  $6.2$  Hz, 1 H, H – 5'), 2.29 (ddd,  $J = 12.5, 5.3$  und  $2.2$  Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.06 (s, 3 H, -OAc), 1.97 (s, 3 H, -OAc), 1.75 (ddd,  $J = 12.5, 11.6$  und  $11.5$  Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.17 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

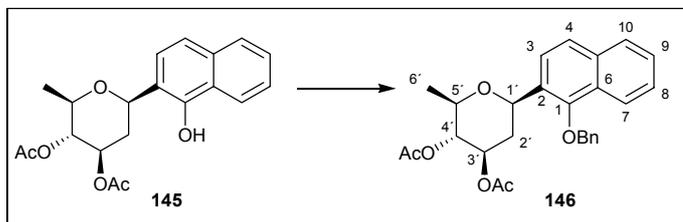
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, d<sub>6</sub> DMSO, DMSO = 39.5 ppm):  $\delta = 169.9$  (C<sub>q</sub>, -OAc), 169.8 (C<sub>q</sub>, -OAc), 148.3 (C<sub>q</sub>, C – 1), 133.6 (C<sub>q</sub>, C – 5), 127.5 (CH, C – 10), 125.9 (CH, C – 8), 125.1 (C<sub>q</sub>, C 2), 125.0 (CH, C – 9), 124.3 (CH, C – 3), 122.2 (CH, C – 7), 121.8 (C<sub>q</sub>, C – 6), 119.5 (CH, C – 4), 74.2 (CH, C – 4'), 73.5 (CH, C – 5'), 71.7 (CH, C – 3'), 71.3 (CH, C – 1'), 37.2 (CH<sub>2</sub> C – 2'), 20.8 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 20.7 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 17.9 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M - H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>: 357.1338, gefunden: 357.1337.

Apricotfarbener Schaum, MG = C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> = 358.39 g/mol.

### 9.22.3 Benzylierung des Glycosids **145**

1-(1-(Benzyloxy)naphthol)-3,4-di-O-acetyl- $\beta$ -D-arabino-tetrahydro-pyran (**146**)



Unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff werden 285 mg (0.795 mmol) des Glycosids **145** in 20 mL THF gelöst. Im Anschluss werden 294 mg (0.0795 mmol) Tetrabutylammoniumiodid und 5 mL Benzylbromid hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 0°C gekühlt und nach 10 werden 468 mg (1.590 mmol) Silberoxid hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 Std. bei 0°C stark gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Silberoxid über Kieselgur abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingengt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc → Cyc/EE=15:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 330 mg (0.736 mmol) = 93 %.

**Rf:** 0.35 (Cyclohexan : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = -11.9$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.16$  (d,  $J = 8.8$  Hz, 1 H, H – 7), 7.86 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1 H, H – 10), 7.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 9), 7.58 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 8), 7.53 – 7.36 (m, 7 H, H – 3, H – 4, -OBn), 5.15 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 5.11 (ddd,  $J = 11.3, 9.4$  und  $5.1$  Hz, 1 H, H – 3'), 5.08 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 4.99 (dd,  $J = 11.6$  und  $2.1$  Hz, 1 H, H – 1'), 4.88 (t,  $J = 9.5$  Hz, 1 H, H – 4'), 3.54 (dq,  $J = 9.5$  und  $6.2$  Hz, 1 H, H – 5'), 2.22 (ddd,  $J = 12.9, 5.1$  und  $2.1$  Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.10 (s, 3 H, -OAc), 2.06 (s, 3 H, -OAc), 1.95 (ddd,  $J = 12.9, 11.6$  und  $11.3$  Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.17 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

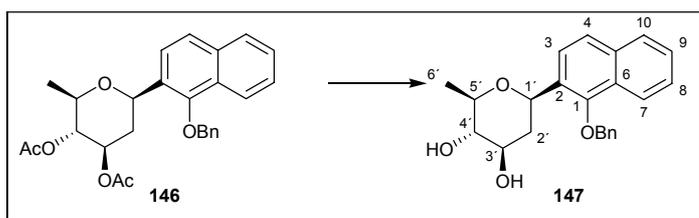
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 170.3$  ( $\text{C}_q$ , -OAc), 170.2 ( $\text{C}_q$ , -OAc), 151.4 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 137.1 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 134.7 ( $\text{C}_q$ , C - 5), 129.1 ( $\text{C}_q$ , C - 6), 128.7 (CH, -OBn) 128.2 (CH, C - 10), 128.1 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.7 ( $\text{C}_q$ , C - 2), 126.3 (CH, C - 3), 126.1 (CH, C - 4), 124.8 (CH, C - 9), 123.9 (CH, C - 8), 122.4 (CH, C - 7), 77.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 74.7 (CH, C - 4'), 74.3 (CH, C - 5'), 72.2 (CH, C - 3'), 71.7 (CH, C - 1'), 37.4 ( $\text{CH}_2$ , C - 2'), 20.8 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 20.8 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 17.9 ( $\text{CH}_3$ , C - 6') ppm.

**EI-MS:** ( $\text{M}^+$ ) berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_6$ : 448.1886, gefunden: 448.1887.

Oranger Schaum,  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_6$ , MG = 5448.51 g/mol.

#### 9.22.4 Entschützung des Glycosids **146**

1-(1-(Benzyloxy)naphthol)- $\beta$ -D-*arabino*- tetrahydro-pyran (**147**)



421 mg (0.939 mmol) des Glycosids **146** werden in 10 mL Dichlormethan gelöst. Im Anschluss werden 10 mL Methanol und 8 mg (0.148 mmol) Natriummethanolat hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit 20 mL Phosphatpuffer (pH 7.0) versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester=20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 339 mg (0,930 mmol) = 99%.

**Rf:** 0.19 (Petrolether : Essigsäureethylester = 1:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +6.8$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 8.15 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, H – 7), 7.85 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, H – 10), 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 9), 7.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 8), 7.53 – 7.38 (m, 7 H, H – 3, H – 4, -OBn), 5.13 (d, *J* = 11.5 Hz, 1 H, -OBn), 5.07 (d, *J* = 11.5 Hz, 1 H, -OBn), 4.96 (dd, *J* = 11.6 und 2.0 Hz, 1 H, H – 1'), 3.68 (ddd, *J* = 11.4, 9.0 und 4.9 Hz, 1 H, H – 3'), 3.37 (dq, *J* = 9.0 und 6.1 Hz, 1 H, H – 5'), 3.18 (t, *J* = 9.0 Hz, 1 H, H – 4'), 2.07 (ddd, *J* = 12.8, 4.9 und 2.0 Hz, 1 H, H – 2'ax), 1.82 (ddd, *J* = 12.8, 11.6 und 11.4 Hz, 1 H, H – 2'ax), 1.35 (d, *J* = 6.1 Hz, 3 H, H – 6')

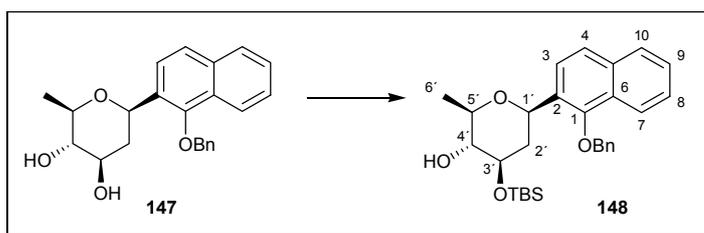
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 151.7 (C<sub>q</sub>, C – 1), 137.3 (C<sub>q</sub>, -OBn), 134.7 (C<sub>q</sub>, C – 5), 129.8 (C<sub>q</sub>, C – 6), 128.7 (CH, -OBn), 128.2 (CH, C – 10), 128.1 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.7 (C<sub>q</sub>, C – 2), 126.2 (CH, C – 3), 126.1 (CH, C – 4), 124.8 (CH, C – 9), 124.3 (CH, C – 8), 122.4 (CH, C – 7), 78.0 (CH, C – 4'), 77.1 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 76.0 (CH, C – 5'), 73.4 (CH, C – 3'), 71.9 (CH, C – 1'), 40.0 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 18.2 (CH<sub>3</sub>, C – 6')

**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>: 363.1596, gefunden: 363.1601.

Leicht oranger Schaum, C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>, MG = 364.43 g/mol.

### 9.22.5 Selektive Silylierung des Glycosids **147** an Position 3'

1-(1-(Benzyloxy)naphthol)-3-O- *tert*butyl-dimethylsilyl-β-D-*arabino*- tetrahydro-pyran (**148**)



Unter Ausschluss von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden 149 mg (0.409 mmol) des Glycosids **147** in DMF gelöst. Unter Eiskühlung werden 77 µL (71 mg, 0.658 mmol) 2,6-Lutidin zu getropft. Nach 5 Minuten werden 104 µL (120 mg, 0.409 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltrifluoromethansulfonat langsam zu getropft. Anschließend wird 2 h bei RT gerührt. Danach werden weitere 24 µL (22 mg, 0.206 mmol) 2,6-Lutidin und im Anschluss 47 µL (55 mg, 0.206 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltrifluoromethansulfonat zu getropft. Es wird wiederum 1 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die

Reaktionsmischung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cy→Cyc/EE=15:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 181 mg (0.378 mmol) = 91 %.

**Rf:** 0.44 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

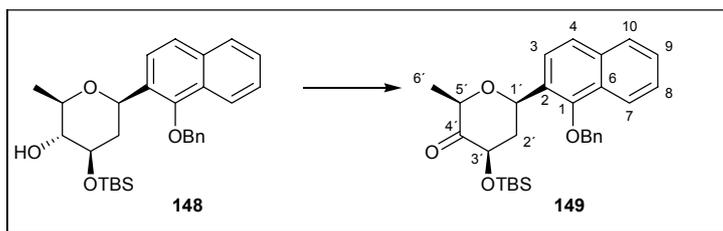
**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.7$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.20$  (d,  $J = 7.5$  Hz, 1 H, H - 7), 7.89 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H - 10), 7.73 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H - 9), 7.67 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H - 8), 7.61 – 7.45 (m, 7 H, H - 3, H - 4, -OBn), 5.20 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 5.09 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 5.03 (dd,  $J = 11.4$  und 1.9 Hz, 1 H, H - 1'), 3.77 (ddd,  $J = 11.0$ , 8.5 und 4.9 Hz, 1 H, H - 3'), 3.49 (dq,  $J = 9.0$  und 6.1 Hz, 1 H, H - 5'), 3.18 (dt,  $J = 9.0$  und 1.5 Hz, 1 H, H - 4'), 2.40 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H, -OH), 2.15 (ddd,  $J = 12.8$ , 4.9 und 1.9 Hz, 1 H, H - 2'\_{\text{äq}}), 1.91 (ddd,  $J = 12.8$ , 11.4 und 11.0 Hz, 1 H, H - 2'\_{\text{ax}}), 1.43 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3 H, H - 6'), 0.94 (s, 9 H, -OTBS), 0.16 (s, 3 H, -OTBS), 0.11 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 151.3$  ( $\text{C}_q$ , C - 1), 137.4 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 134.6 ( $\text{C}_q$ , C - 5), 130.1 ( $\text{C}_q$ , C - 6), 128.7 (CH, -OBn), 128.2 (CH, C - 10), 128.1 (CH, -OBn), 127.8 ( $\text{C}_q$ , C - 2), 127.7 (CH, -OBn), 126.1 (CH, C - 4), 126.0 (CH, C - 3), 124.8 (CH, C - 9), 124.3 (CH, C - 8), 122.3 (CH, C - 7), 77.8 (CH, C - 4'), 77.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 75.7 (CH, C - 5'), 74.7 (CH, C - 3'), 71.9 (CH, C - 1'), 40.9 ( $\text{CH}_2$ , C - 2'), 25.7 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), 18.4 ( $\text{CH}_3$ , C - 6'), 17.9 ( $\text{C}_q$ , -OTBS), -4.2 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), -4.7 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS) ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für  $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Si}$ : 479.2618, gefunden: 479.2615.

Leicht oranger Schaum,  $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Si}$ , MG = 478.70 g/mol.

9.22.6 Oxidation des Alkohols **148** an C 4' zum Keton **149**

Unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff werden 50 mg (0.105 mmol) des Glycosids **148** in Dichlormethan gelöst. Bei 0°C werden 112 mg (0.263 mmol) DMP zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur 12 h gerührt. Im Anschluss werden 4 mL Natriumthiosulfatlösung zugegeben und 30 min kräftig gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird 3-mal mit 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc → Cyc/EE=5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 45 mg (0.069 mmol) = 91 %.

**Rf:** 0.63 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +21.7$  ( $c = 1.03$ , CHCl<sub>3</sub>).

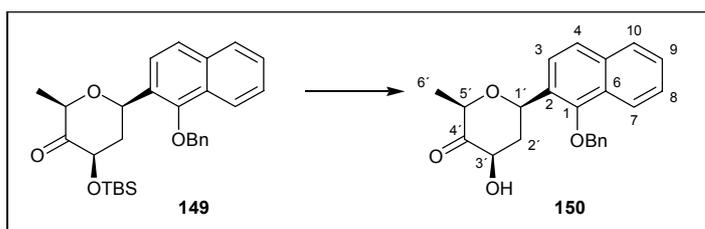
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):  $\delta = 8.18$  (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 7), 7.88 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 10), 7.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 9), 7.58 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 8), 7.56 – 7.42 (m, 7 H, H – 3, H – 4, -OBn), 5.33 (dd,  $J = 11.4$  und 1.9 Hz, 1 H, H – 1'), 5.25 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 5.13 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 4.38 (dd,  $J = 12.5$  und 7.7 Hz, 1 H, H – 3'), 3.49 (q,  $J = 6.4$  Hz, 1 H, H – 5'), 2.15 (ddd,  $J = 12.8, 7.7$  und 1.9 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.36 (ddd,  $J = 12.8, 11.4$  und 11.4 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.35 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3 H, H – 6'), 0.91 (s, 9 H, -OTBS), 0.18 (s, 3 H, -OTBS), 0.06 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 205.7$  ( $\text{C}_q$ , C - 4'), 151.4 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 137.4 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 134.8 ( $\text{C}_q$ , C - 5), 128.9 ( $\text{C}_q$ , C - 6), 128.7 (CH, -OBn) 128.3 (CH, C - 10), 128.2 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.7 ( $\text{C}_q$ , C - 2), 126.4 (CH, C - 3), 126.2 (CH, C - 4), 124.9 (CH, C - 9), 123.9 (CH, C - 8), 122.3 (CH, C - 7), 77.9 (CH, C - 5'), 77.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 74.5 (CH, C - 3'), 72.0 (CH, C - 1'), 44.8 ( $\text{CH}_2$ , C - 2'), 25.7 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), 18.4 ( $\text{CH}_3$ , C - 6'), 14.5 ( $\text{C}_q$ , -OTBS), -4.5 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), -5.4 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS) ppm.

**HRMS (ESI):** ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> berechnet für  $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{Si}$ : 476.3283, gefunden: 476.3283.

Helloranger Schaum,  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{Si}$  MG = 476,68 g/mol.

### 9.17.7 Desilylierung des Glycosids **149** zum Alkohol **150**



863 mg des Glycosids **149** werden in 15 mL THF gelöst. Im Anschluss werden 4 mL HF Pyridin dazu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung neutralisiert und mit 4 mal 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc/EE = 5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 459 mg (1.267 mmol) = 70%.

**Rf:** 0.28 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

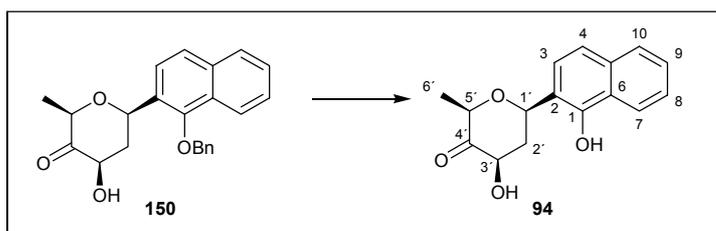
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.17$  (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 7), 7.87 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 10), 7.68 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 9), 7.54 – 7.41 (m, 8 H, H – 3, H-4, H – 8, -OBn), 5.34 (dd,  $J = 11.6$  und 1.7 Hz, 1 H, H – 1'), 5.22 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 5.14 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 4.35 (dd,  $J = 11.9$  und 7.2 Hz, 1 H, H – 3'), 4.05 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, H – 5'), 3.54 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1 H, -OH), 2.57 (ddd,  $J = 13.0, 7.2$  und 1.7 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.20 (ddd,  $J = 13.0, 11.9$  und 11.6 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.35 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 207.5$  ( $\text{C}_q$ , C – 4'), 151.5 ( $\text{C}_q$ , C – 1), 137.3 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 134.9 ( $\text{C}_q$ , C – 5), 128.9 ( $\text{C}_q$ , C – 6), 128.5 (CH, -OBn) 128.4 (CH, C – 10), 128.2 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.7 ( $\text{C}_q$ , C – 2), 126.5 (CH, C – 3), 126.3 (CH, C – 4), 125.0 (CH, C – 9), 123.8 (CH, C – 8), 122.5 (CH, C – 7), 77.2 (CH, C – 5'), 77.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 73.1 (CH, C – 3'), 71.7 (CH, C – 1'), 44.2 ( $\text{CH}_2$ , C – 2'), 14.2 ( $\text{CH}_3$ , C – 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_4$ : 361.1440, gefunden: 361.1442.

Gelber Schaum,  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_4$ , MG = 362.42 g/mol.

### 9.22.8 Finale Entschützung zum Produkt 94



597 mg (1.647 mmol) des Glycosids **150** werden in 30 mL Essigsäureethylester gelöst. Im Anschluss werden bei 0°C unter Ausschluss von Sauerstoff 120 mg Palladium auf Aktivkohle (10% Pd) hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 193 mg (0.709 mmol) = 43 %.

**Rf:** 0.28 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 8.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 4), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 7), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H – 3), 6.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H – 9), 5.30 (dd, *J* = 11.4 und 1.9 Hz, 1 H, H – 1'), 3.71 (ddd, *J* = 11.9, 7.1 und 1.1 Hz, 1 H, H – 3'), 3.98 (dq, *J* = 6.3 und 1.2 Hz, 1 H, H – 5'), 2.09 (ddd, *J* = 13.1, 7.1 und 2.0 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.35 (ddd, *J* = 12.7, 12.0 und 12.0 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.34 (d, *J* = 6,0 Hz, 3 H, H-6')

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 205.7 (C<sub>q</sub>, C – 4'), 154.9 (C<sub>q</sub>, C – 10), 151.2 (C<sub>q</sub>, C – 1), 129.6 (C<sub>q</sub>, C – 6), 129.0 (C<sub>q</sub>, C – 5), 127.1 (C<sub>q</sub>, C – 2), 126.3 (CH, C – 8), 123.2 (CH, C – 3), 119.3 (CH, C – 4), 114.8 (CH, C – 7), 105.8 (CH, C – 9), 77.9 (CH, C – 5'), 74.6 (CH, C – 3'), 72.0 (CH, C – 1'), 44.8 (CH<sub>2</sub> C – 2'), 14.5 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

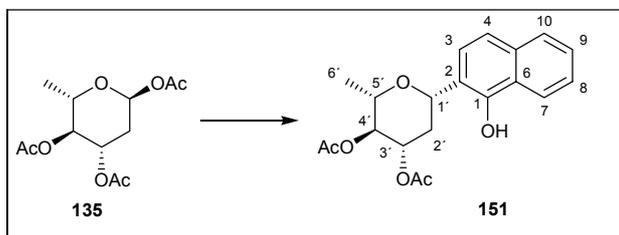
**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>: 271.0970, gefunden: 271.0974.

Farbloses Öl, C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>, MG = 272,30 g/mol.

## 9.23 Versuche zu Kapitel 7.7

### 9.23.1 Kupplung mit Naphthol 138

1-(1-Naphthol)-3,4-di-O-acetyl-β-L-arabino- tetrahydro-pyran (**151**)



Unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff werden 1.0 mg (3.65 mmol) des Acylglycosids und 1.05 mg des Aromaten (7.29 mmol) in absolutem Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung werden 200 mg Molsieb (5 Å) gegeben. Bei -30°C werden 922 µL (1040 mg, 7.292 mmol) Bortrifluoretherat (verdünnt auf 3 µL mit abs. Dichlormethan), tropfen

weise zu der Reaktionslösung gegeben. Während der Zugabe wird die Lösung tief gelb. Nach Beendigung der Zugabe wird die Reaktionslösung langsam über 10 Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsmischung wird weitere 12 Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Mischung mit Wasser hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert (3x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Flashchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester = 20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 746 mg (2.082 mmol) = 57%.

**Rf:** 0.29 (Cyclohexan : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +44.0$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, = 7.26 ppm):  $\delta$  = 8.45 (s, 1 H, -OH), 8.28 – 8.25 (m, 1 H, H – 7), 7.76 - 7.73 (m, 1 H, H – 10), 7.49 – 7.46 (m, 2 H, H – 8, H – 9), 7.33 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1 H, H – 4), 7.01 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 3), 5.16 (ddd,  $J = 11.5, 9.6$  und  $5.2$  Hz, 1 H, H – 3'), 4.97 (t,  $J = 9.6$  Hz, 1 H, H – 4'), 4.90 (dd,  $J = 11.9$  und  $2.4$  Hz, 1 H, H – 1'), 3.75 (dq,  $J = 9.6$  und  $6.2$  Hz, 1 H, H – 5'), 2.47 (ddd,  $J = 13.3, 5.2$  und  $2.4$  Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.11 (s, 3 H, -OAc), 2.09 (ddd,  $J = 13.3, 11.9$  und  $11.5$  Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 2.03 (s, 3 H, -OAc), 1.37 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

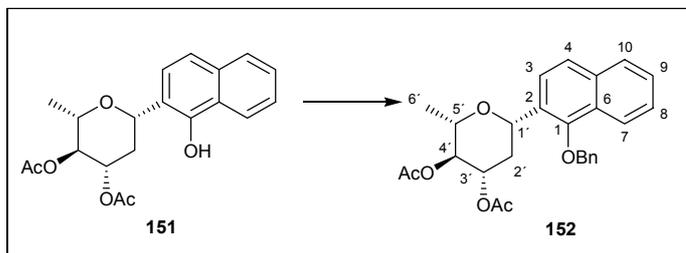
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, = 77.0 ppm):  $\delta$  = 170.4 (C<sub>q</sub>, -OAc), 170.0 (C<sub>q</sub>, -OAc), 150.7 (C<sub>q</sub>, C – 1), 134.0 (C<sub>q</sub>, C – 5), 127.2 (CH, C – 10), 126.5 (CH, C – 8), 125.4 (C<sub>q</sub>, C – 2), 125.3 (CH, C – 9), 124.1 (CH, C – 3), 122.1 (CH, C – 7), 119.5 (CH, C – 4), 116.4 (C<sub>q</sub>, C – 6), 79.2 (CH, C – 4'), 75.1 (CH, C – 5'), 73.8 (CH, C – 3'), 71.6 (CH, C – 1'), 37.2 (CH<sub>2</sub> C – 2'), 20.9 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 20.8 (CH<sub>3</sub>, -OAc), 18.0 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

**HRMS (ESI):** (M - H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>: 357.1338, gefunden: 357.1338.

Apricotfarbener Schaum, C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> MG = 358.39 g/mol.

### 9.23.2 Benzylierung des Glycosids **151**

1-(1-(Benzyloxy)naphthol)-3,4-di-O-acetyl- $\beta$ -L-arabino-tetrahydro-pyran (**152**)



Unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff werden 746 mg (2.086 mmol) des Glycosids **151** in 50 mL THF gelöst. Im Anschluss werden 768 mg (2.086 mmol) Tetrabutylammoniumiodid und 10 mL Benzylbromid hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 0°C gekühlt und nach 30 Minuten werden 964 mg (4.172 mmol) Silberoxid hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2.5 Std. bei 0°C stark gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Silberoxid über Kieselgel abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc → Cyc/EE = 10:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 853 mg (1.902 mmol) = 91 %.

**Rf:** 0.35 (Cyclohexan : Essigsäureethylester = 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +11.9$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):  $\delta$  = 8.17 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H – 7), 7.88 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, H – 10), 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 9), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 8), 7.55 – 7.40 (m, 7 H, H – 3, H – 4, -OBn), 5.17 (d, *J* = 11.6 Hz, 1 H, -OBn), 5.11 (ddd, *J* = 11.5, 9.4 und 5.2 Hz, 1 H, H – 3'), 5.09 (d, *J* = 11.6 Hz, 1 H, -OBn), 4.99 (dd, *J* = 11.6 und 2.0 Hz, 1 H, H – 1'), 4.88 (t, *J* = 9.4 Hz, 1 H, H – 4'), 3.54 (dq, *J* = 9.4 und 6.1 Hz, 1 H, H – 5'), 2.22 (ddd, *J* = 12.8, 5.2 und 2.0 Hz, 1 H, H – 2'<sub>aq</sub>), 2.11 (s, 3 H, -OAc), 2.04 (s, 3 H, -OAc), 1.96 (ddd, *J* = 12.8, 11.6 und 11.5 Hz, 1 H, H – 2'<sub>ax</sub>), 1.25 (d, *J* = 6,1 Hz, 3 H, H – 6')

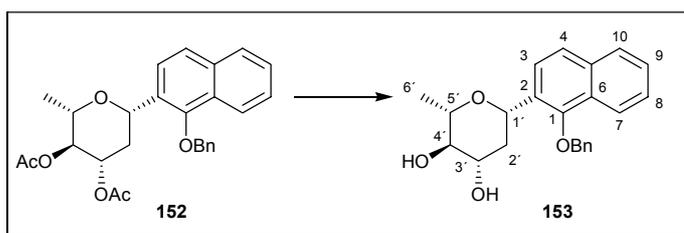
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 170.3$  ( $\text{C}_q$ , -OAc), 170.2 ( $\text{C}_q$ , -OAc), 151.5 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 137.1 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 134.7 ( $\text{C}_q$ , C - 5), 129.2 ( $\text{C}_q$ , C - 6), 128.7 (CH, -OBn) 128.3 (CH, C - 10), 128.2 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.7 ( $\text{C}_q$ , C - 2), 126.3 (CH, C - 3), 126.2 (CH, C - 4), 124.9 (CH, C - 9), 124.0 (CH, C - 8), 122.5 (CH, C - 7), 77.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 74.7 (CH, C - 4'), 74.4 (CH, C - 5'), 72.3 (CH, C - 3'), 71.8 (CH, C - 1'), 37.5 ( $\text{CH}_2$ , C - 2'), 21.0 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 20.9 ( $\text{CH}_3$ , -OAc), 18.0 ( $\text{CH}_3$ , C - 6') ppm.

**EI-MS:** ( $\text{M}^+$ ) berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_6$ : 448.1886, gefunden: 448.1887.

Apricotfarbener Schaum  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_6$ , MG = 448.51 g/mol.

### 9.23.3 Entschützung des Glycosids **152**

1-(1-(Benzyloxy)naphthol)- $\beta$ -L-*arabino*- tetrahydro-pyran (**153**)



833 mg (1.857 mmol) des Glycosids **152** werden in 10 mL Dichlormethan gelöst. Im Anschluss werden 10 mL Methanol und 25 mg (0.371 mmol) Natriummethanolat hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit 20 mL Phosphatpuffer (pH 7.0) versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wird der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Essigsäureethylester=20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 653 mg (1.792 mmol) = 96%.

**Rf:** 0.19 (Petrolether : Essigsäureethylester = 1:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.8$  ( $c = 1.00$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD, MeOH = 3.31 ppm):  $\delta$  = 8.12 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1 H, H – 7), 7.86 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1 H, H – 10), 7.67 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1 H, H – 9), 7.56 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1 H, H – 8), 7.52 – 7.38 (m, 7 H, H – 3, H – 4, -OBn), 5.11 (d,  $J$  = 11.3 Hz, 1 H, -OBn), 5.05 (d,  $J$  = 11.3 Hz, 1 H, -OBn), 4.99 (dd,  $J$  = 11.6 und 2.1 Hz, 1 H, H – 1'), 3.56 (ddd,  $J$  = 11.4, 9.3 und 4.9 Hz, 1 H, H – 3'), 3.54 (dq,  $J$  = 9.3 und 6.1 Hz, 1 H, H – 5'), 3.03 (t,  $J$  = 9.3 Hz, 1 H, H – 4'), 2.02 (ddd,  $J$  = 12.8, 4.9 und 2.1 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 1.96 (ddd,  $J$  = 12.8, 11.6 und 11.4 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.30 (d,  $J$  = 6,1 Hz, 3 H, H – 6')

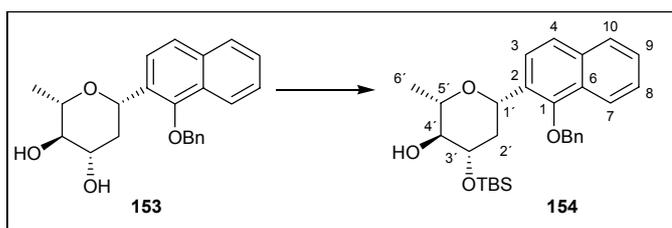
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, MeOD d<sub>4</sub>, MeOH = 49.0 ppm):  $\delta$  = 152.7 (C<sub>q</sub>, C – 1), 138.8 (C<sub>q</sub>, -OBn), 136.7 (C<sub>q</sub>, C – 5), 131.5 (C<sub>q</sub>, C – 6), 129.7 (CH, -OBn) 129.3 (CH, C – 10), 129.2 (CH, -OBn), 129.1 (CH, -OBn), 127.7 (C<sub>q</sub>, C – 2), 127.3 (CH, C – 3), 127.2 (CH, C – 4), 125.5 (CH, C – 9), 125.4 (CH, C – 8), 123.4 (CH, C – 7), 78.8 (CH, C – 4'), 78.3 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 77.9 (CH, C – 5'), 74.0 (CH, C – 3'), 73.4 (CH, C – 1'), 41.6 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 18.6 (CH<sub>3</sub>, C – 6')

**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>: 363.1596, gefunden: 363.1599.

Leicht oranger Schaum, C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>, MG = 364.43 g/mol.

#### 9.23.4 Selektive Silylierung des Glycosids **153** an Position 3'

1-(1-(Benzyloxy)naphthol)-3-O-tertbutyl-dimethylsilyl- $\beta$ -L-*arabino*- tetrahydro-pyran (**154**)



Unter Ausschluss von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden 633 mg (1.74 mmol) des Glycosids **153** in DMF gelöst. Unter Eiskühlung werden 304  $\mu$ L (279 mg, 2.61 mmol) 2,6-Lutidin zu getropft. Nach 5 Minuten werden 403  $\mu$ L (464 mg, 1.76 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltrifluoromethansulfonat langsam zu getropft. Anschließend wird 2 h bei RT gerührt. Danach werden weitere 21  $\mu$ L (19 mg, 0.17 mmol) 2,6-Lutidin und im Anschluss 40  $\mu$ L (46 mg, 0.17 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltrifluoromethansulfonat zu getropft. Es wird wiederum 1 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird die

Reaktionsmischung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung hydrolysiert und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cy  $\rightarrow$  Cyc/EE = 15:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 663 mg (1.391 mmol) = 80 %.

**Rf:** 0.44 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

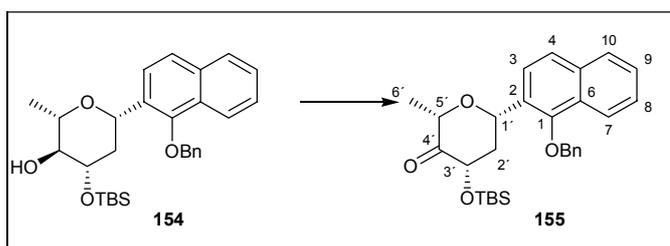
**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.7$  ( $c = 1.01$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 8.16$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H, H – 7), 7.86 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1 H, H – 10), 7.69 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H – 9), 7.62 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1 H, H – 8), 7.55 – 7.41 (m, 7 H, H – 3, H – 4, -OBn), 5.16 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1 H, -OBn), 5.05 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1 H, -OBn), 4.98 (dd,  $J = 11.6$  und 2.0 Hz, 1 H, H – 1'), 3.71 (ddd,  $J = 11.0$ , 9.0 und 4.8 Hz, 1 H, H – 3'), 3.43 (dq,  $J = 9.0$  und 6.0 Hz, 1 H, H – 5'), 3.23 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1 H, H – 4'), 2.08 (ddd,  $J = 12.8$ , 4.8 und 2.0 Hz, 1 H, H – 2'\_{\text{aq}}), 1.86 (ddd,  $J = 12.8$ , 11.6 und 11.0 Hz, 1 H, H – 2'\_{\text{ax}}), 1.37 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3 H, H – 6'), 0.89 (s, 9 H, -OTBS), 0.11 (s, 3 H, -OTBS), 0.06 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 151.4$  ( $\text{C}_q$ , C – 1), 137.4 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 134.6 ( $\text{C}_q$ , C – 5), 130.1 ( $\text{C}_q$ , C – 6), 128.7 (CH, -OBn), 128.2 (CH, C – 10), 128.1 (CH, -OBn), 127.8 (CH, -OBn), 127.7 ( $\text{C}_q$ , C – 2), 126.2 (CH, C – 3), 126.1 (CH, C – 4), 124.8 (CH, C – 9), 124.3 (CH, C – 8), 122.3 (CH, C – 7), 77.9 (CH, C – 4'), 77.1 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 75.8 (CH, C – 5'), 74.8 (CH, C – 3'), 72.0 (CH, C – 1'), 41.0 ( $\text{CH}_2$ , C – 2'), 25.8 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), 18.6 ( $\text{CH}_3$ , C – 6'), 18.0 ( $\text{C}_q$ , -OTBS), -4.1 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), -4.7 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS) ppm.

**HRMS (ESI):** (M+H)<sup>+</sup> berechnet für  $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Si}$ : 479.2618, gefunden: 479.2620.

Leicht oranger Schaum,  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{Si}$ , MG = 478.70 g/mol.

9.23.5 Oxidation des Alkohols **154** an C 4' zum Keton **155**

Unter Ausschluss von Feuchtigkeit und Sauerstoff werden 643 mg (1.350 mmol) des Glycosids **154** in 20 mL Dichlormethan gelöst. Bei 0°C werden 1431 mg (3.374 mmol) DMP zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur 12 h gerührt. Im Anschluss werden 25 mL Natriumthiosulfatlösung hinzu gegeben und 30 min kräftig gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird 3-mal mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc → Cyc/EE = 20:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 592 mg (1.242 mmol) = 92 %.

**Rf:** 0.63 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1)

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +21.5$  ( $c = 0.99$ , CHCl<sub>3</sub>).

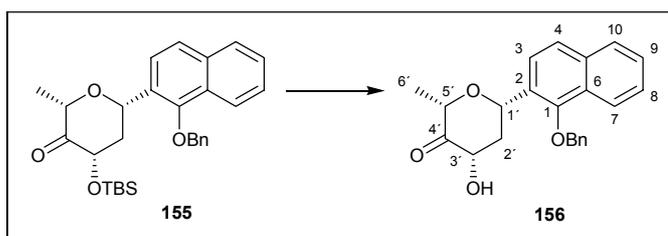
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm):  $\delta = 8.18$  (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, H – 7), 7.88 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1 H, H – 10), 7.69 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 9), 7.57 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1 H, H – 8), 7.58 – 7.39 (m, 7 H, H – 3, H – 4, -OBn), 5.32 (dd,  $J = 11.4$  und 1.9 Hz, 1 H, H – 1'), 5.24 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 5.12 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1 H, -OBn), 4.37 (dd,  $J = 11.8$  und 7.0 Hz, 1 H, H – 3'), 3.98 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1 H, H – 5'), 2.49 (ddd,  $J = 13.0$ , 7.0 und 1.9 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.36 (ddd,  $J = 13.0$ , 11.8 und 11.4 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.34 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3 H, H – 6'), 0.90 (s, 9 H, -OTBS), 0.17 (s, 3 H, -OTBS), 0.05 (s, 3 H, -OTBS) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 77.0$  ppm):  $\delta = 205.7$  ( $\text{C}_q$ , C - 4'), 151.4 ( $\text{C}_q$ , C - 1), 137.4 ( $\text{C}_q$ , -OBn), 134.8 ( $\text{C}_q$ , C - 5), 128.9 ( $\text{C}_q$ , C - 6), 128.7 (CH, -OBn) 128.3 (CH, C - 10), 128.2 (CH, -OBn), 127.7 (CH, -OBn), 127.6 ( $\text{C}_q$ , C - 2), 126.4 (CH, C - 3), 126.2 (CH, C - 4), 124.9 (CH, C - 9), 123.9 (CH, C - 8), 122.3 (CH, C - 7), 77.9 (CH, C - 5'), 77.2 ( $\text{CH}_2$ , -OBn), 74.6 (CH, C - 3'), 72.0 (CH, C - 1'), 44.8 ( $\text{CH}_2$ , C - 2'), 25.7 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), 18.4 ( $\text{C}_q$ , -OTBS), 14.5 ( $\text{CH}_3$ , C - 6'), -4.6 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS), -5.4 ( $\text{CH}_3$ , -OTBS) ppm.

**HRMS (ESI):** ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> berechnet für  $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{Si}$ : 476.3283, gefunden: 476.3283.

Leicht oranger Schaum;  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{Si}$ , MG = 582.80 g/mol.

### 9.23.6 Desilylierung des Glycosids **155** zum Alkohol **156**



572 mg (1.2 mmol) des Glycosids **155** werden in 15 mL THF gelöst. Im Anschluss werden 4 mL HF Pyridin dazu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung neutralisiert und mit 4 mal 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Cyc/EE=5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 426 mg (1.175 mmol) = 98%.

**Rf:** 0.40 (Petrolether : Essigsäureethylester = 3:1).

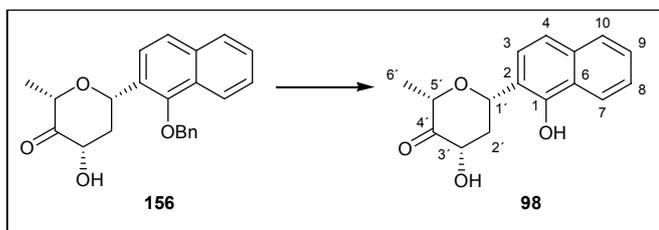
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 8.17 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H – 7), 7.87 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H – 10), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H – 9), 7.54 – 7.41 (m, 8 H, H – 3, H – 4, H – 8, -OBn), 5.34 (dd, *J* = 11.6 und 1.7 Hz, 1 H, H – 1'), 5.22 (d, *J* = 11.9 Hz, 1 H, -OBn), 5.14 (d, *J* = 11.9 Hz, 1 H, -OBn), 4.35 (dd, *J* = 12.2 und 7.2 Hz, 1 H, H – 3'), 4.05 (q, *J* = 6.4 Hz, 1 H, H – 5'), 3.55 (d, *J* = 3.1 Hz, 1 H, -OH), 2.57 (ddd, *J* = 12.8, 7.2 und 1.7 Hz, 1 H, H – 2'\_{aq}), 2.20 (ddd, *J* = 12.8, 12.2 und 11.9 Hz, 1 H, H – 2'\_{ax}), 1.36 (d, *J* = 6.4 Hz, 3 H, H – 6')

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 207.6 (C<sub>q</sub>, C – 4'), 151.5 (C<sub>q</sub>, C – 1), 137.3 (C<sub>q</sub>, -OBn), 134.9 (C<sub>q</sub>, C – 5), 128.7 (C<sub>q</sub>, C – 6), 128.5 (CH, -OBn) 128.4 (CH, C – 10), 128.2 (CH, -OBn), 127.9 (CH, -OBn), 127.7 (C<sub>q</sub>, C – 2), 126.5 (CH, C – 3), 126.3 (CH, C – 4), 125.0 (CH, C – 9), 123.8 (CH, C – 8), 122.4 (CH, C – 7), 77.3 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 77.1 (CH, C – 5'), 73.2 (CH, C – 3'), 71.7 (CH, C – 1'), 44.2 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 14.3 (CH<sub>3</sub>, C – 6')

**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für (C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>): 361,1440, gefunden: 361,1441.

Oranger Schaum, C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>, MG = 362.42 g/mol.

### 9.23.7 Finale Entschützung zum Produkt 98



406 mg (1.120 mmol) des Glycosids **156** werden in 20 mL Essigsäureethylester gelöst. Im Anschluss werden bei 0°C unter Ausschluss von Sauerstoff 81 mg Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) hinzu gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 5:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 136 mg (0.499 mmol) = 45 %

**Rf:** 0.40 (Petrolether : Essigsäureethylester = 1:1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 8.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H - 4), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H - 7), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H - 3), 6.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H - 9), 5.30 (dd, *J* = 11.4 und 1.9 Hz, 1 H, H - 1'), 3.71 (ddd, *J* = 11.9, 7.1 und 1.1 Hz, 1 H, H - 3'), 3.98 (dq, *J* = 6.3 und 1.2 Hz, 1 H, H - 5'), 2.09 (ddd, *J* = 13.1, 7.1 und 2.0 Hz, 1 H, H - 2'\_{aq}), 2.35 (ddd, *J* = 12.7, 12.0 und 12.0 Hz, 1 H, H - 2'\_{ax}), 1.34 (d, *J* = 6,0 Hz, 3 H, H - 6') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 205.7 (C<sub>q</sub>, C - 4'), 154.9 (C<sub>q</sub>, C - 10), 151.2 (C<sub>q</sub>, C - 1), 129.6 (C<sub>q</sub>, C - 6), 129.0 (C<sub>q</sub>, C - 5), 127.1 (C<sub>q</sub>, C - 2), 126.3 (CH, C - 8), 123.2 (CH, C - 3), 119.3 (CH, C - 4), 114.8 (CH, C - 7), 105.8 (CH, C - 9), 77.9 (CH, C - 5'), 74.6 (CH, C - 3'), 72.0 (CH, C - 1'), 44.8 (CH<sub>2</sub> C - 2'), 14.5 (CH<sub>3</sub>, C - 6') ppm.

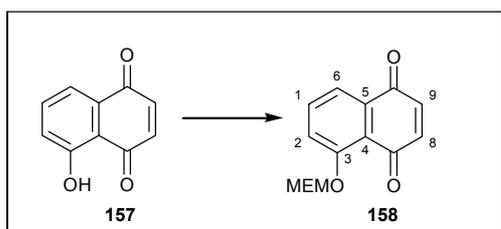
**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für (C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>): 271.0970, gefunden: 271.0974

Farbloses Öl, C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, MG = 272.30 g/mol.

## 9.24 Versuche zu Kapitel 7.8

### 9.24.1 MEM-Schützung von Juglon 157

3-(2-Methoxy-ethoxymethoxy)-[7,10]naphthochinon (**158**)



Zu einer Lösung von 500 mg (2.87 mmol) Juglon in 25 mL Dichlormethan werden 1.30 mL (1.43 g, 11.64 mmol) 1-Chloromethoxy-2-methoxy-ethan langsam bei 0°C zugetropft. Nach 10 Minuten werden 1.5 mL (1.1 mg, 8.550 mmol) Diethyl-isopropylamin langsam über zugetropft. Die Reaktionslösung wird 60 Minuten bei 0°C gerührt und erneut werden 1.5 mL (1.1 mg, 8.550 mmol) Diethyl-isopropylamin langsam zugetropft. Im Anschluss wird die Reaktionsmischung weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung werden 25 mL ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung zugetropft. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester (3 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel

im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 10:1→7:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 638 mg (2.433 mmol) = 87 %.

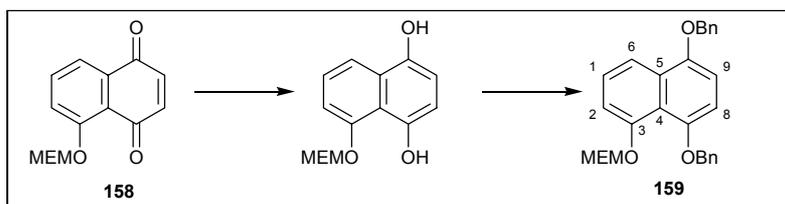
**Rf:** 0.28 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 7.26 ppm): δ = 7.80 (dd, *J* = 7.2 und 1.7 Hz, 1 H, H - 2), 7.67 (dd, *J* = 8.4 und 7.2 Hz, 1 H, H - 1), 7.58 (dd, *J* = 8.4 und 1.7 Hz, 1 H, H - 6), 6.90 (d, *J* = 11.7 Hz, 1 H, H - 9), 6.84 (d, *J* = 11.7 Hz, 1 H, H - 8), 5.45 (s, 2 H, -OMEM), 3.98 – 3.93 (m, 2 H, -OMEM), 3.62 – 3.58 (m, 2 H, -OMEM), 3.36 (s, 3 H, -OMEM) ppm.

Die Spektren stimmen mit denen in der Literatur überein<sup>184</sup>.

### 9.24.2 Reduktion und Benzylschützung von MEM-Juglon

7,10-Bisbenzyloxy-3-(2-methoxy-ethoxymethoxy)-naphthalin



Zu einer Lösung von 638 mg (2.433 mmol) 3-(2-Methoxy-ethoxymethoxy)-[7,10] naphthochinon **158** in Essigsäureethylester werden unter Ausschluss von Sauerstoff 230 mg Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 Std. unter Wasserstoffatmosphäre bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle wird die Reaktion beendet und die Reaktionslösung durch Filtration über Kieselgur vom Pd/C getrennt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne Aufarbeitung weiter umgesetzt. Das Rohprodukt wird mit 20 mL DMF versetzt. Unter Ausschluss von Sauerstoff und Wasser werden bei 0°C 230 mg (9.584 mmol) Natriumhydrid hinzu gegeben. Im Anschluss werden 1.14 mL (1642 mg, 9.584 mmol) Benzylbromid tropfenweise zu gegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt. Zur Zerstörung des überschüssigen Natriumhydrids werden unter Eiskühlung 6 mL Ethanol hinzugeben. Im Anschluss werden 10 mL ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung und 250 mL Wasser

<sup>184</sup> G. Matsuo, Y. Miki, M. Nakata, S. Matsumura, K. Toshima, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 7101 - 7106.

versetzt und mit Diethylether (4 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 10:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 525 mg (1.183 mmol) = 49 %.

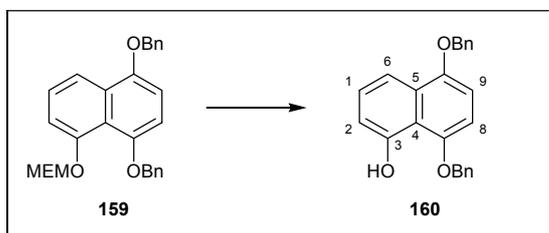
**Rf:** 0.28 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  = 7.26 ppm):  $\delta$  = 8.08 (dd,  $J$  = 8.4 und 1.3 Hz, 1 H, H - 2), 7.60 – 7.22 (m, 12 H, H - 1, H - 6, -OBn), 6.85 (d,  $J$  = 14.1 Hz, 1 H, H - 8), 6.80 (d,  $J$  = 14.1 Hz, 1 H, H - 9), 5.31 (s, 2 H, -OMEM), 5.20 (s, 2 H, -OBn), 5.12 (s, 2 H, -OBn), 3.85 – 3.80 (m, 2 H, -OMEM), 3.54 – 3.50 (m, 2 H, -OMEM), 3.37 (s, 3 H, -OMEM) ppm.

Die Spektren stimmen mit denen in der Literatur überein<sup>170</sup>.

### 9.24.3 MEM-Entschützung des Naphthalinderivats

7,10-Bis-benzyloxy-naphthalin-3-ol (**160**)



Zu einer Lösung von 525 mg (1.185 mmol) 7,10-Bisbenzyloxy-3-(2-methoxyethoxymethoxy)-naphthalin **159** in 20 mL Dichlormethan werden bei 0°C 120  $\mu\text{L}$  (165 mg, 1.422 mmol) Trifluoressigsäure zugegeben. Die Reaktionslösung wird 2 Std. bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle, wurden weitere 120  $\mu\text{L}$  Trifluoressigsäure zugetropft. Nach weiteren 2 Std. wird die Reaktion mit Wasser hydrolysiert und mit NaOH-Lösung (1M) neutralisiert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (PE/EE = 10:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 198 mg (0.556 mmol) = 47 %.

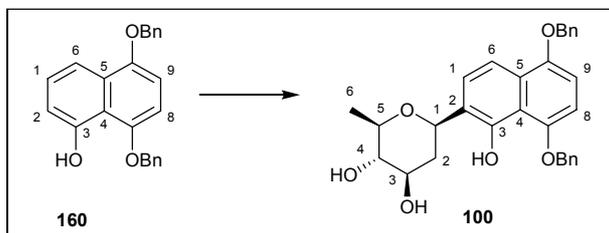
**Rf:** 0.38 (Petrolether : Essigsäureethylester = 4:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 9.54$  (s, 1 H, -OH), 7.80 (dd,  $J = 8.4$  und 1.2 Hz, 1 H, H – 2), 7.55 – 7.35 (m, 12 H, H – 1, H – 6, -OBn), 6.93 (dd,  $J = 7.7$  und 1.1 Hz, 1 H, H – 2), 6.74 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1 H, H – 8), 6.70 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1 H, H – 9), 5.22 (s, 2 H, -OBn), 5.19 (s, 2 H, -OBn) ppm.

Die Spektren stimmen mit denen in der Literatur überein<sup>170</sup>.

#### 9.24.4 Kupplung des Aromaten mit D-Olivose 161

7,10-Bis-benzyloxy-naphthalin-3-ol- $\beta$ -D-arabino- tetrahydro-pyran (**100**)



Zu einer Lösung von 15 mg (0.101 mmol) D-Olivose und 89 mg (0.250 mmol) 5,8-Bis-benzyloxy-naphthalin-1-ol in 5 mL Acetonitril (abs.) werden unter Ausschluss von Sauerstoff und Wasser 13  $\mu\text{L}$  (16 mg, 0.072 mmol) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat zugetropft. Es wird 1 Std. unter Argonatmosphäre bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 100  $\mu\text{L}$  Triethylamin hydrolysiert und dann eingeeengt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/MeOH = 10:1) gereinigt. Die Ausbeute beträgt 3 mg (0.006 mmol) = 6 %.

**Rf:** 0.28 (Dichlormethan / Methanol = 10:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3 = 7.26$  ppm):  $\delta = 9.79$  (s, 1 H, -OH), 7.84 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H – 4), 7.60 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H – 3), 7.49 – 7.34 (m, 10 H, -OBn), 6.75 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H – 8), 6.68 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H, H – 9), 5.21 (s, 2 H, -OBn), 5.19 (s, 2 H, -OBn), 5.03 (dd,  $J = 11.2$  und 1.8 Hz, 1 H, H – 1'), 4.44 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1 H, 4'-OH), 3.81 (ddd,  $J = 11.3, 9.0$  und 4.8 Hz, 1 H, H – 3'), 3.51 (dq,  $J = 9.0$  und 6.2 Hz, 1 H, H – 5'), 3.22 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1 H, H – 4'), 2.36 (ddd,  $J = 12.7, 4.8$  und 1.8 Hz, 1 H, H – 2'eq), 2.14 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1 H, 3'-OH), 1.65 (ddd,  $J = 12.7, 11.3$  und 11.2 Hz, 1 H, H – 2'ax), 1.39 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3 H, H – 6') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> = 77.0 ppm): δ = 149.9 (C<sub>q</sub>, C – 10), 149.5 (C<sub>q</sub>, C – 1), 149.3 (C<sub>q</sub>, C – 7), 137.2 (C<sub>q</sub>, -OBn), 135.4 (C<sub>q</sub>, -OBn), 129.0 (CH, -OBn), 128.7 (CH, -OBn), 128.5 (CH, -OBn), 128.0 (CH, -OBn), 127.9 (C<sub>q</sub>, C – 2), 127.8 (CH, -OBn), 127.2 (CH, -OBn), 124.8 (CH, C – 3), 123.5 (C<sub>q</sub>, C – 5), 115.4 (C<sub>q</sub>, C – 6), 113.4 (CH, C – 4), 104.9 (CH, C – 8), 104.6 (CH, C – 9), 78.3 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 75.8 (CH<sub>2</sub>, -OBn), 73.5 (CH, C – 4'), 72.0 (CH, C – 5'), 71.3 (CH, C – 3'), 70.4 (CH, C – 1'), 39.7 (CH<sub>2</sub>, C – 2'), 18.2 (CH<sub>3</sub>, C – 6') ppm.

Farbloses Öl, C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>, MG = 486.56 g/mol

Die Spektren stimmen mit denen in der Literatur überein<sup>170</sup>.

## 9.25 Versuche zu Kapitel 7.9

### 9.25.1 Anzucht und Kultivierung von *Streptomyces violaceoruber* Tü 22

Sporen von *Streptomyces violaceoruber* Tü22 werden auf Agarplatten mit R-S-Medium ausgestrichen. Sie werden bei 27°C 7 Tage lang inkubiert. Nach 2 Tagen ist eine leichte Violettfärbung an einigen Stellen des Agars zu erkennen, die auf die Produktion von Granaticin hinweist.

Parallel wird der Stamm Tü22 auf Agarplatten mit dem Medium Medium 65 ausgestrichen. Diese werden ebenfalls 7 Tage inkubiert. Nach 7 Tagen ist eine deutliche Sporenbildung als weiß-grauer Flaum auf den Platten zu erkennen.

Zur Fermentationskontrolle werden *Streptomyces violaceoruber* in folgenden Medien angezüchtet und die Granaticinproduktion per HPLC überwacht.

Medium NL 19

Medium 65

Medium NL 111

In je zwei 250 mL Schikanekolben mit Stahlfeder werden 50 mL des jeweiligen Mediums mit *Streptomyces violaceoruber* angeimpft und bei 27°C und 250 rpm in einem Inkubator geschüttelt. Jeweils morgens und abends wird von jedem der drei verschiedenen Medien

eine Probe von je 500 µL entnommen und mit 1 mL Essigsäureethylester extrahiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird mit 500 µL MeOH aufgenommen. Die Proben werden über einen 45 µm Membranfilter gegeben. 100 µL der Lösung werden per HPLC zur Beobachtung des Wachstums benutzt.

Zur endgültigen Bestimmung der produzierten Granaticinmenge werden jeweils die zwei Kulturbrühen mit dem gleichen Medium vereinigt. Die Erlenmeyerkolben werden mit wenig Wasser nachgespült um die am Kolbenrand gewachsenen Zellen ernten zu können. Die Suspension wird mit 1 Teelöffel Celite versetzt und gerührt und ohne Vakuum durch eine Glasfritte filtriert. Der Filterkuchen wird zum Aufschließen der Zellen in Aceton suspendiert und für 15 Minuten im Ultraschall behandelt. Im Anschluss wird die Suspension wiederum filtriert und der Filtrerrückstand mit etwas Wasser nachgespült. Das sich im Filtrat befindliche Aceton wird im Vakuum entfernt, bevor die beiden Filtrate vereinigt, mit Kochsalz versetzt und mit Essigsäureethylester und dem Zusatz von AcOH bis zu einem leicht sauren pH-Wert (3 x 250 mL) extrahiert werden. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingengt und die Rohextrakte Säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol = 5:1) von den lipophilen und hydrophilen Begleitstoffen gereinigt.

### 9.25.2 Verfütterung der Synthesebausteine

In einen Schikanekolben mit Stahlfeder werden 50 mL des sterilen Mediums NL-111 gegeben und mit *Streptomyces violaceoruber* angeimpft und bei 27°C und 250 rpm in einem Inkubator geschüttelt. Nach ca. 17 Std. werden 15 mg des jeweiligen Glycosids, gelöst in 500 µL DMSO, verfüttert. Nach weiteren 16 Std. werden wiederum 15 mg des Glycosids in DMSO zugesetzt und nach insgesamt 38 Std. werden noch einmal 20 mg des Glycosids zugegeben. Die Kulturbrühe wird nach 72 Std. wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Reaktion wird mittels HPLC verfolgt.

Probenentnahme 2 Std. nach der letzten Verfütterung.

Probenentnahme 26 Std. nach der letzten Verfütterung.

Probenentnahme 50 Std. nach der letzten Verfütterung.

Im Anschluss folgt die Aufarbeitung der Kulturbrühen wie in der Fermentationsbestimmung beschrieben.

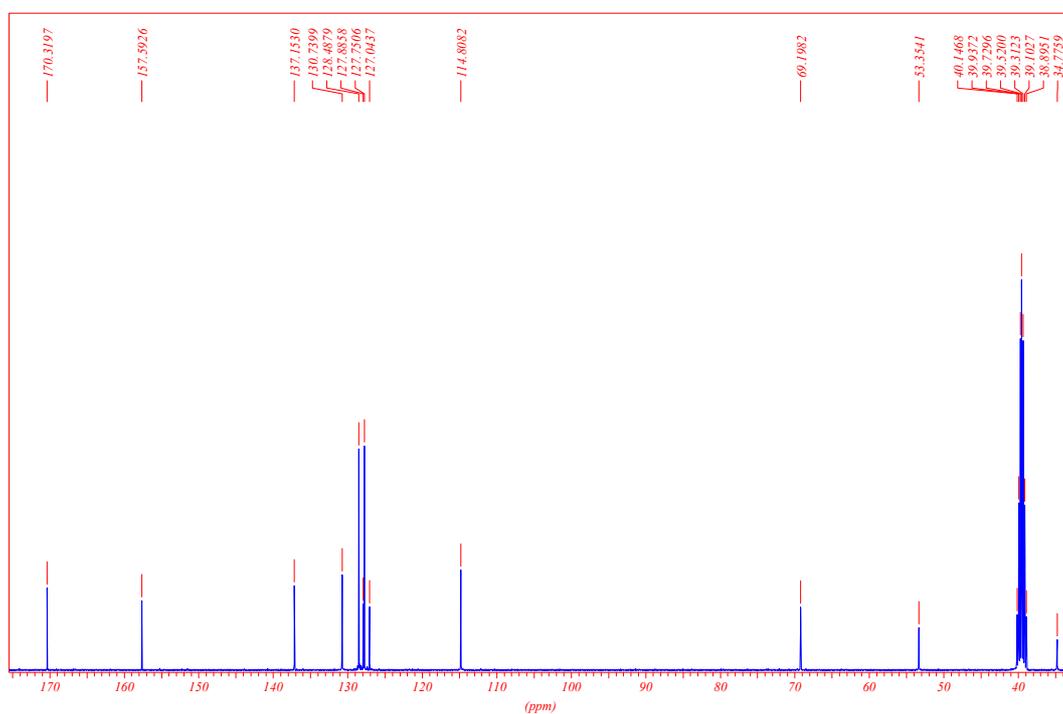
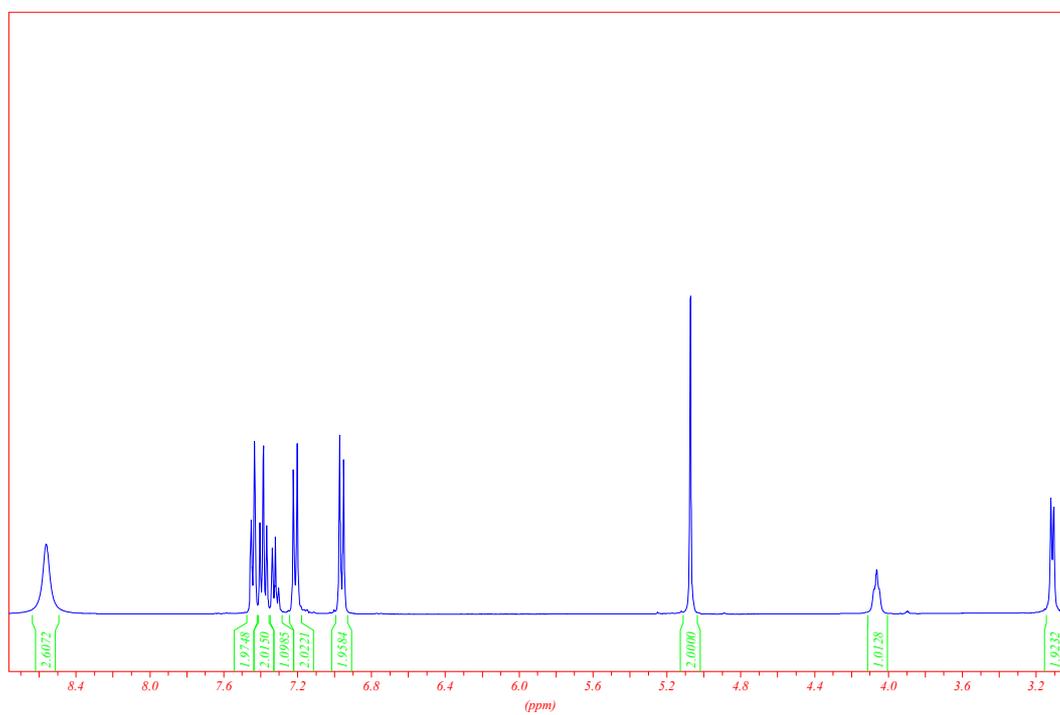
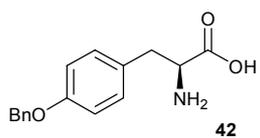
Nach der groben Aufreinigung der Proben durch Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 5:1) werden LC-MS (Gradient H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN = 100:0 → 30:70 in 11 min, dann in 5 min auf 100% CH<sub>3</sub>CN, dann weitere 10 min auf 100% CH<sub>3</sub>CN),

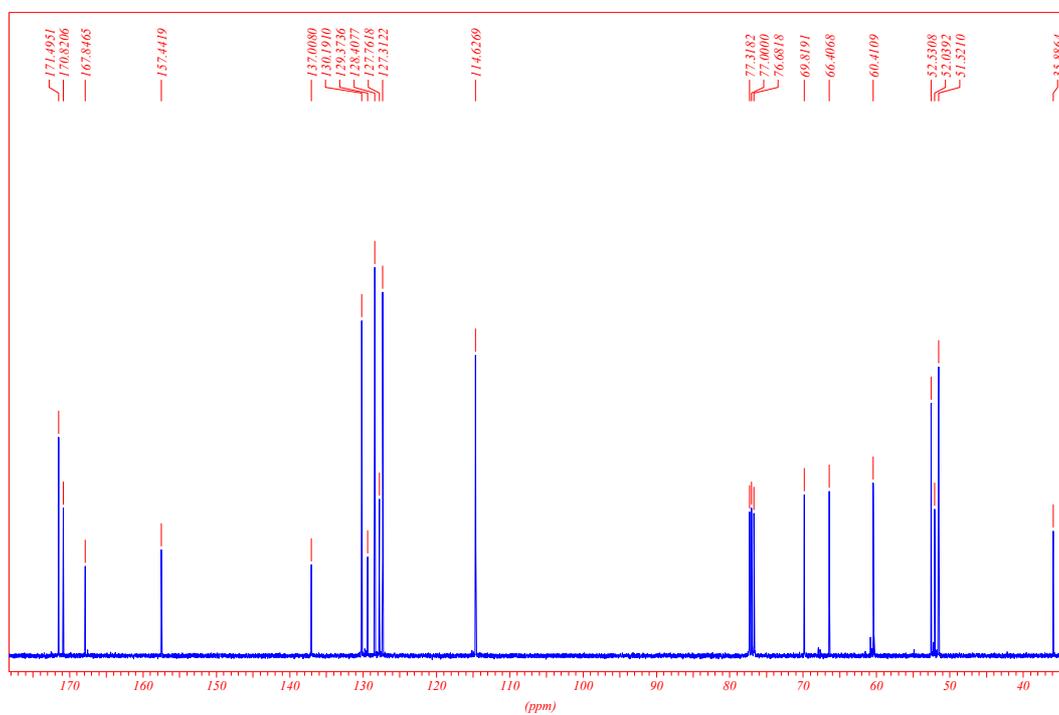
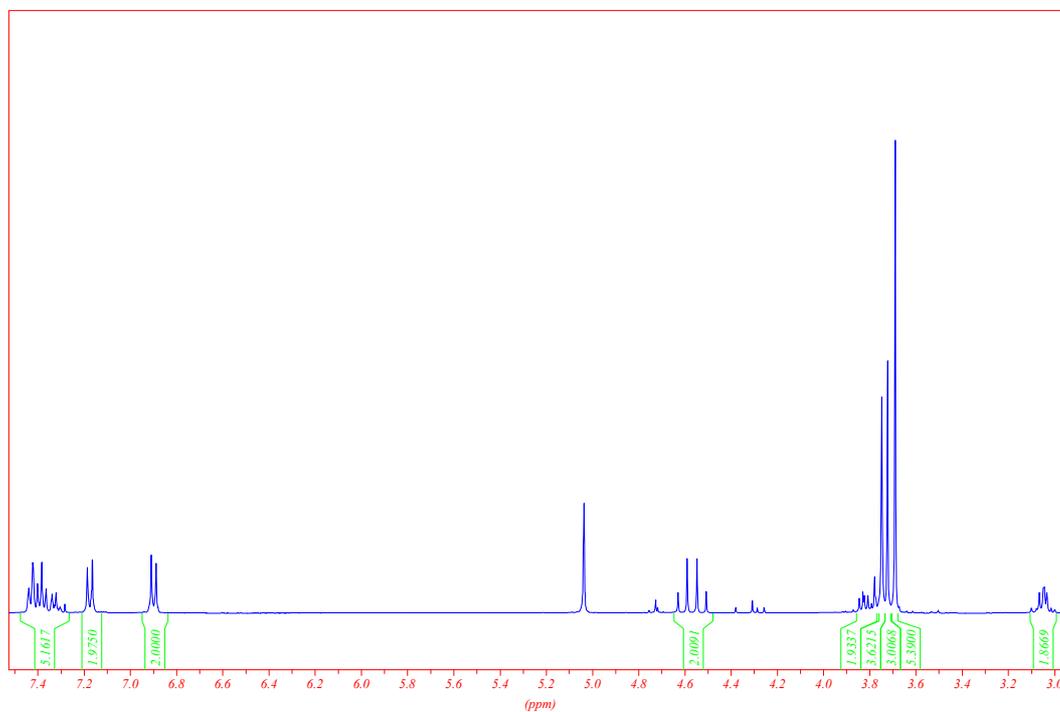
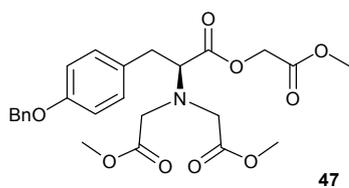
vermeintliches Produkt nach 9.57 min) Spektren gemessen und die Proben, in denen sich Produkte befinden mittels semipräparativer HPLC gereinigt. (Gradient H<sub>2</sub>O/MeOH = 70:30 → 0:100 in 24 min, dann 60 min 100% MeOH, 8.0 ml/min, vermeintliches Produkt um 40 min)

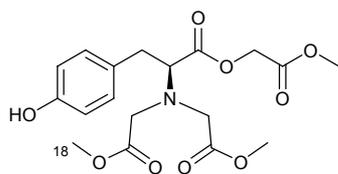
Die so erhaltenen Fraktionen werden wiederum mit HPLC-MS (Gradient H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN = 100:0 → 30:70 in 11 min, dann in 5 min auf 100% CH<sub>3</sub>CN, dann weitere 10 min auf 100% CH<sub>3</sub>CN, vermeintliches Produkt nach 9.57 min) rechromatographiert und die produkthaltigen Fraktionen per HRMS vermessen. Sie ergab, dass es sich nicht um das erwartete Produkt handelte.

Die zwischendurch genommenen Rückstellproben wurden mittels HPLCMS (Gradient wie vorher) vermessen. Das Edukt konnte bei 8.19 min identifiziert werden. Bei 8.31 min konnte ein Produkt mit einer Masse von  $z = 273.0970$  g/mol identifiziert werden. Es handelt sich um die an C-4' reduzierte Substanz. Ein weiterer Peak bei 8.64 hatte ebenfalls die Masse des Edukts und wurde im Verlauf der Fermentation größer. Zur Überprüfung der Möglichkeit, dass dieser Peak von Verbindung **165** stammen könnte. Wurde die Probe mit etwas NaBH<sub>4</sub> versetzt und ein weiteres Mal per HPLC-MS vermessen. Es konnte nur noch der Peak bei 8.31 min mit einer Masse von  $z=273.1125$  g/mol nachgewiesen werden.

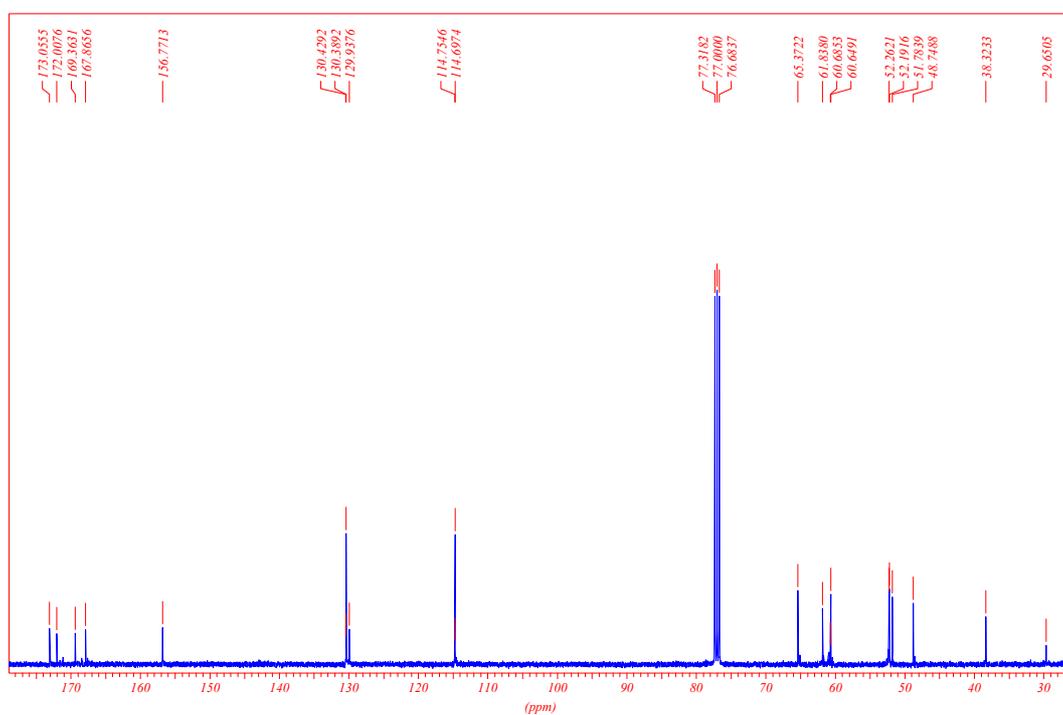
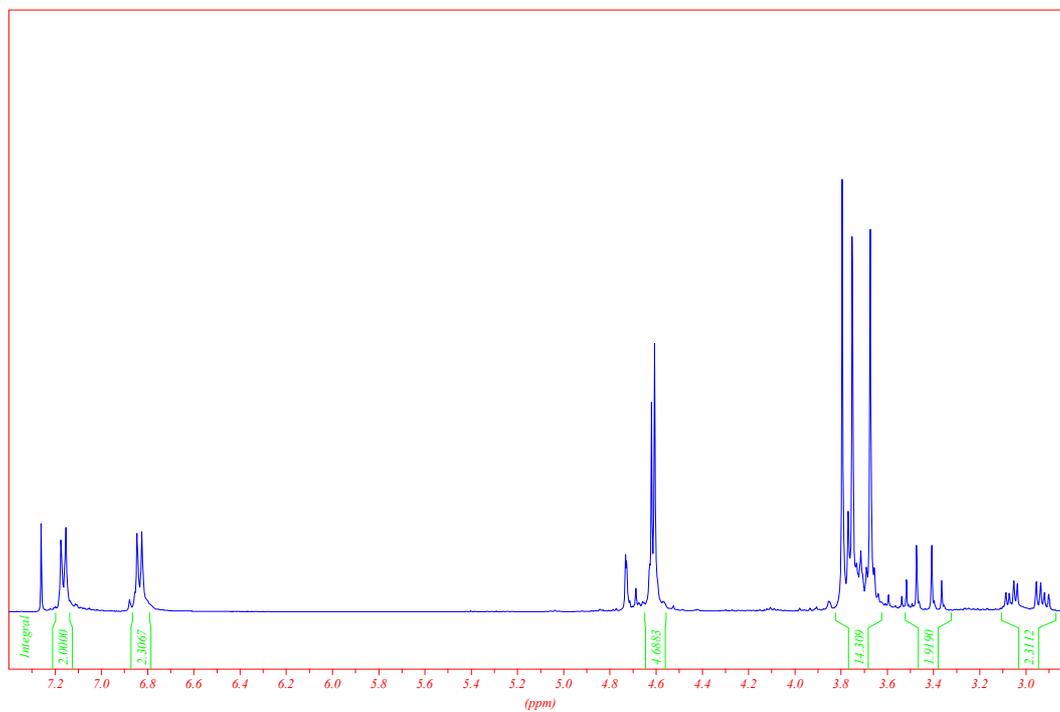
**HRMS (ESI):** (M-H)<sup>-</sup> berechnet für (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>)  $m/z=273.0970$ , gefunden: 273.0973

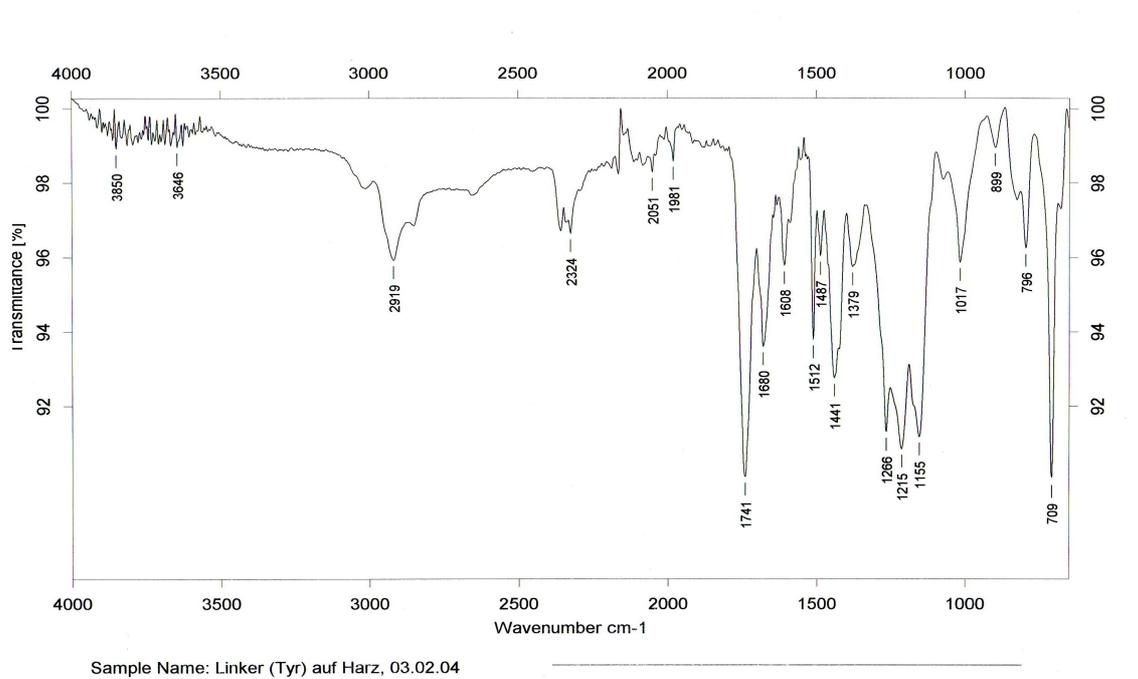
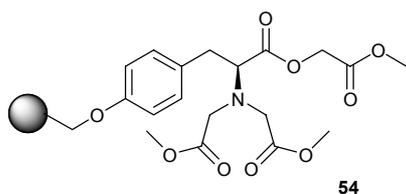
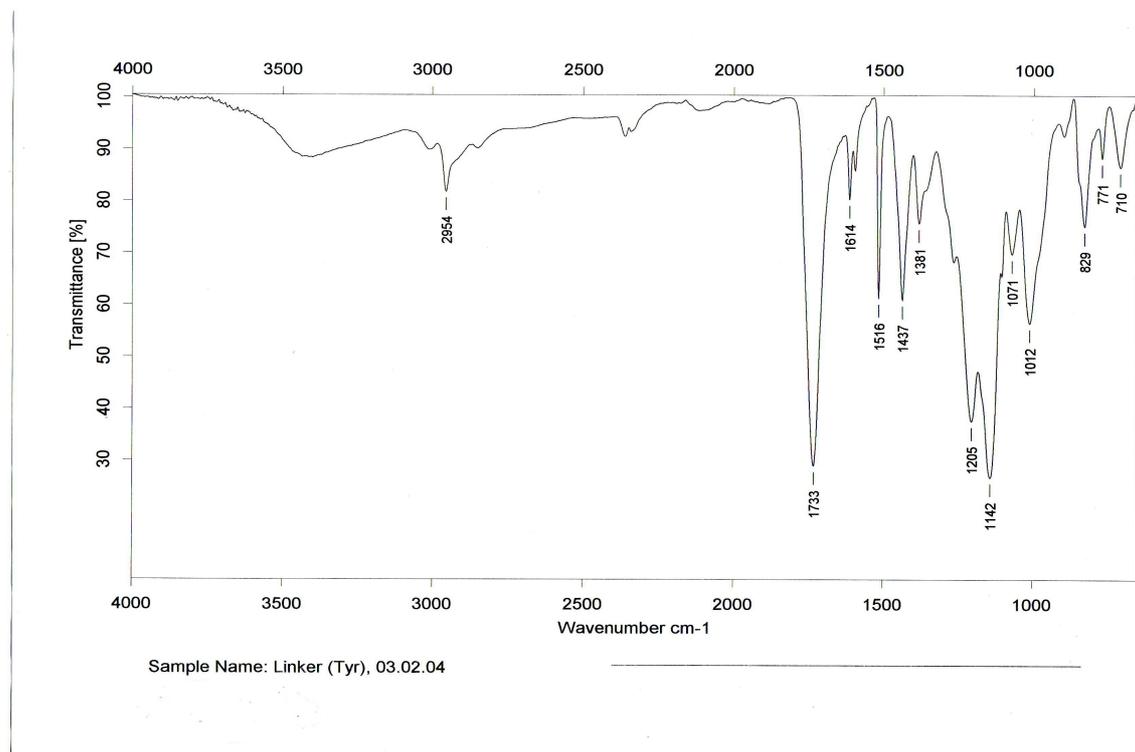


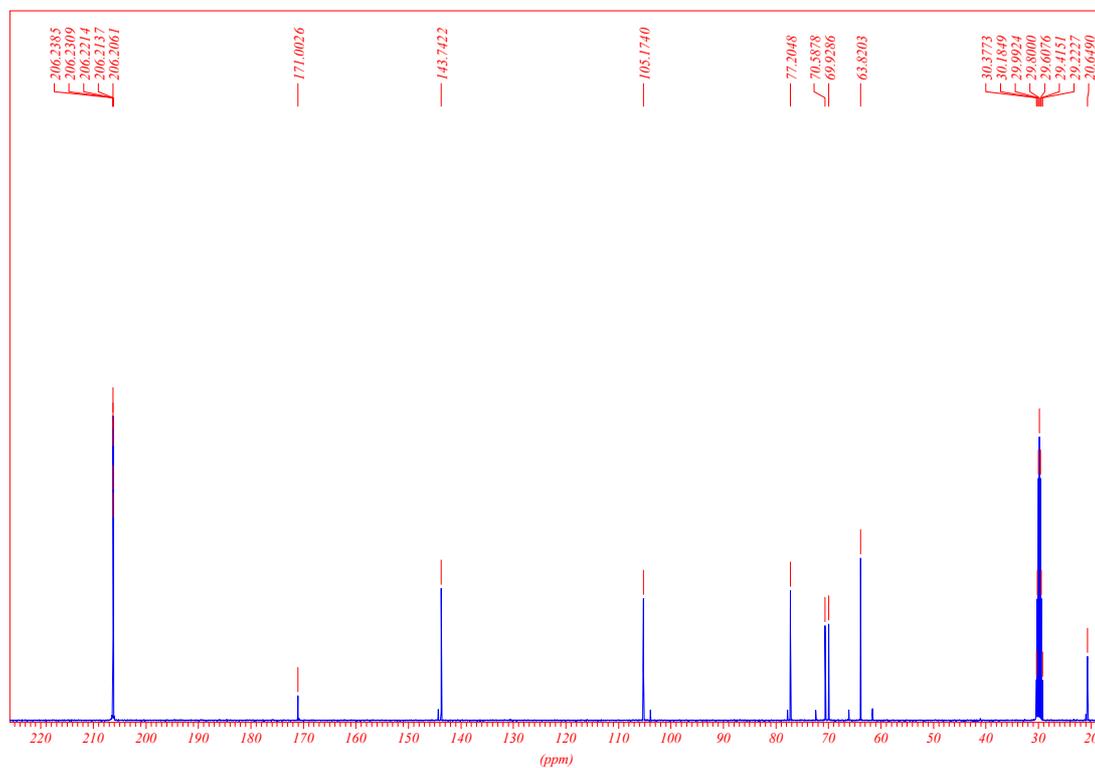
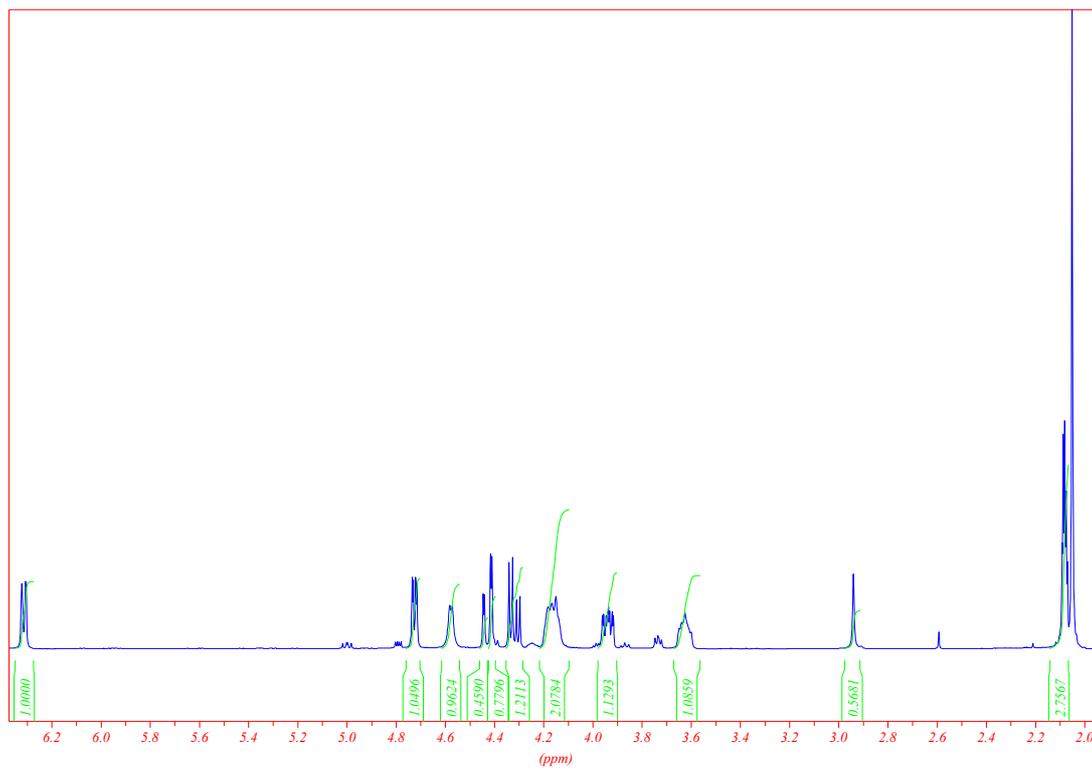
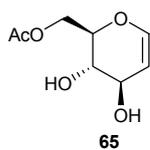


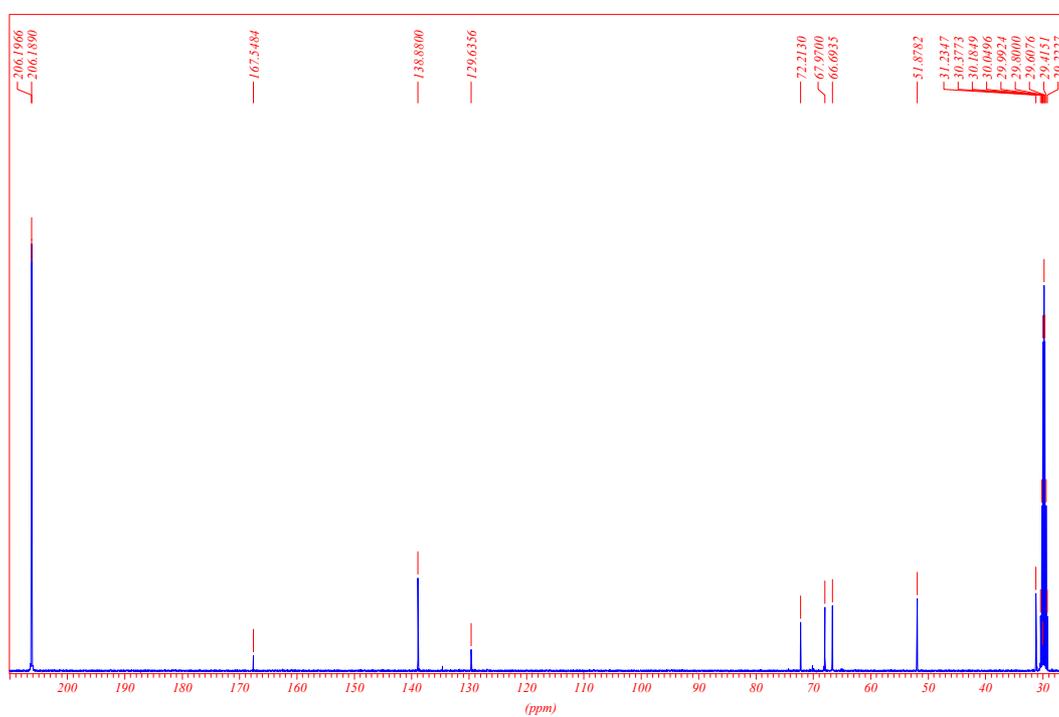
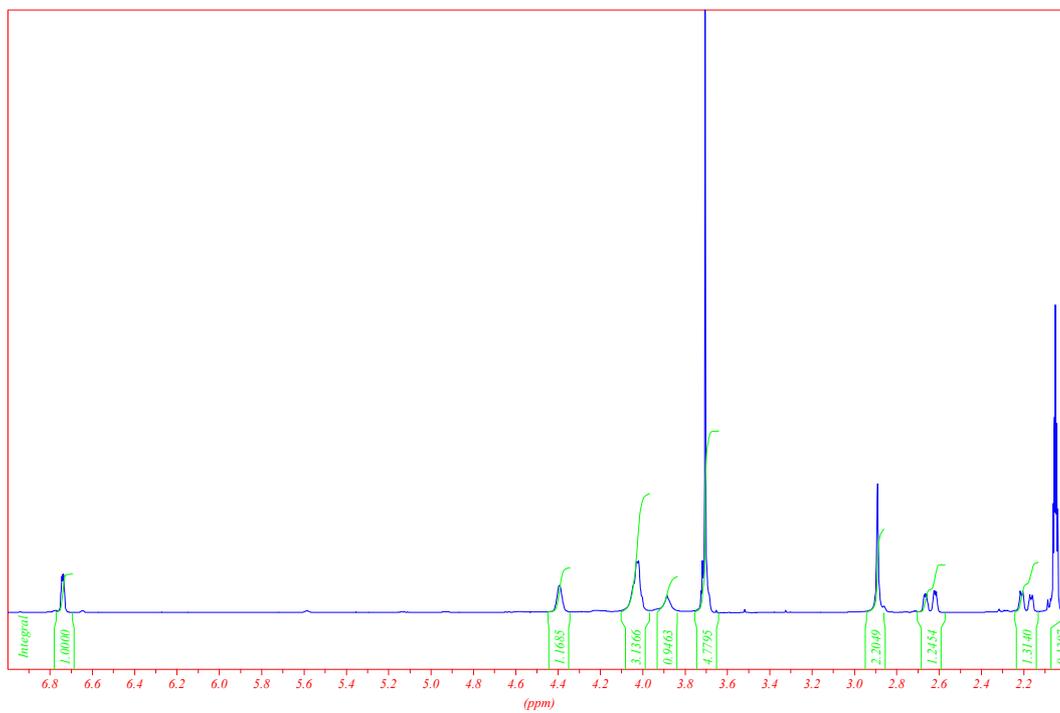
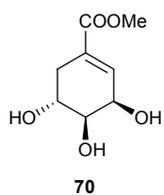


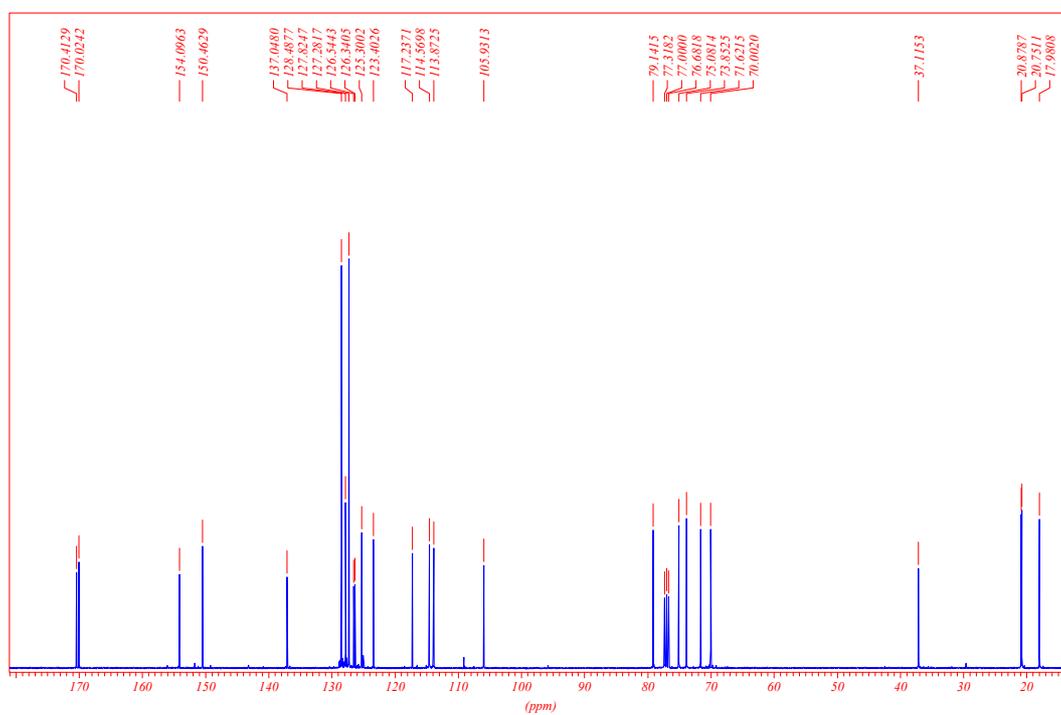
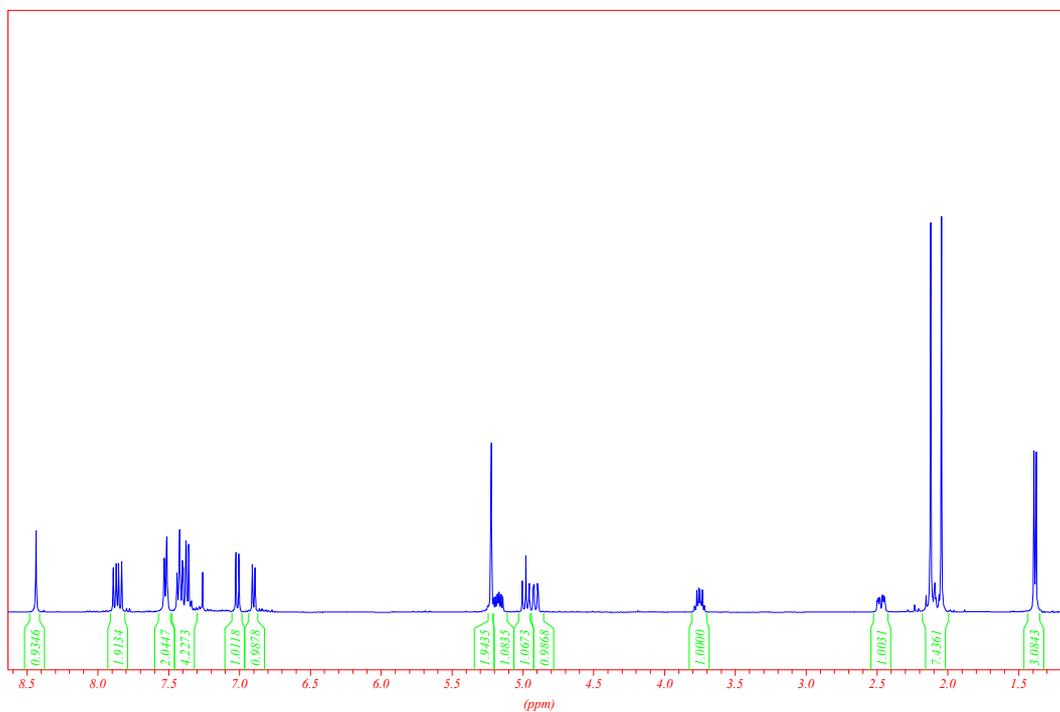
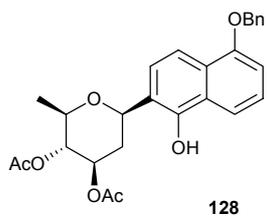
48

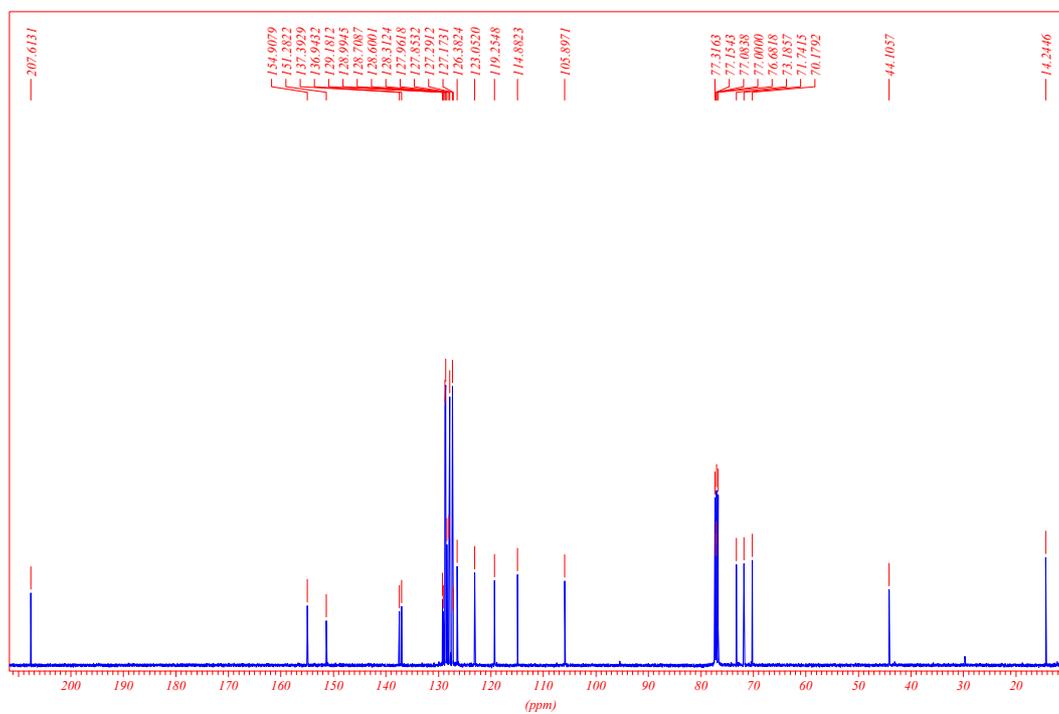
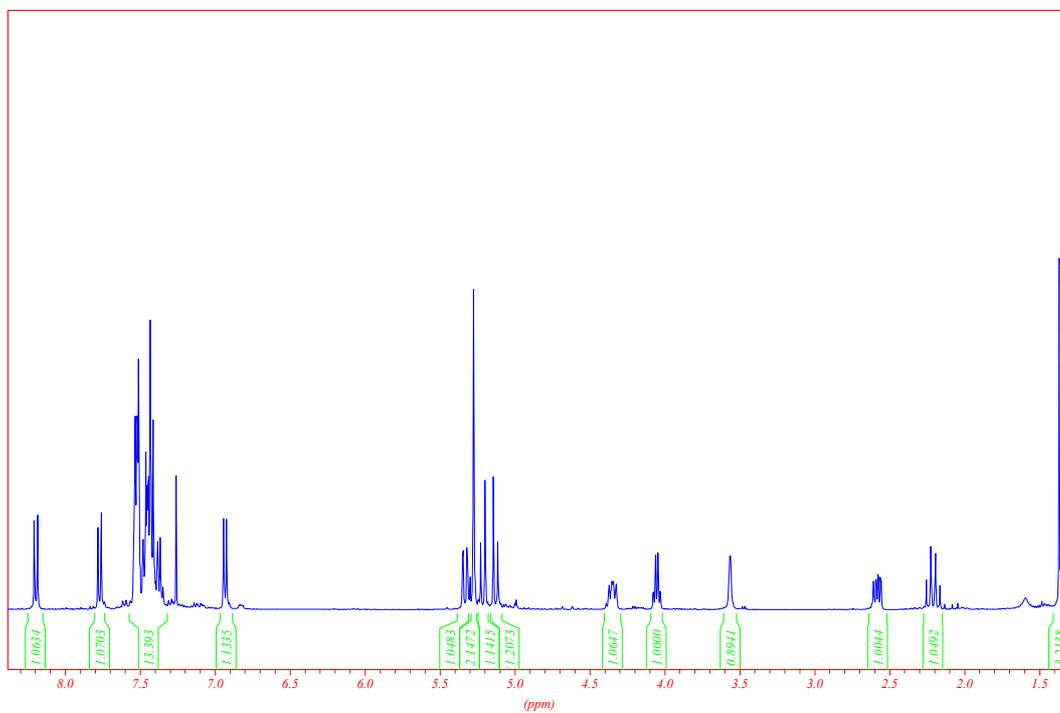
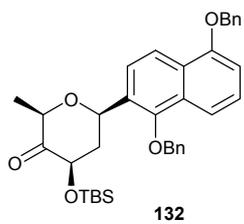


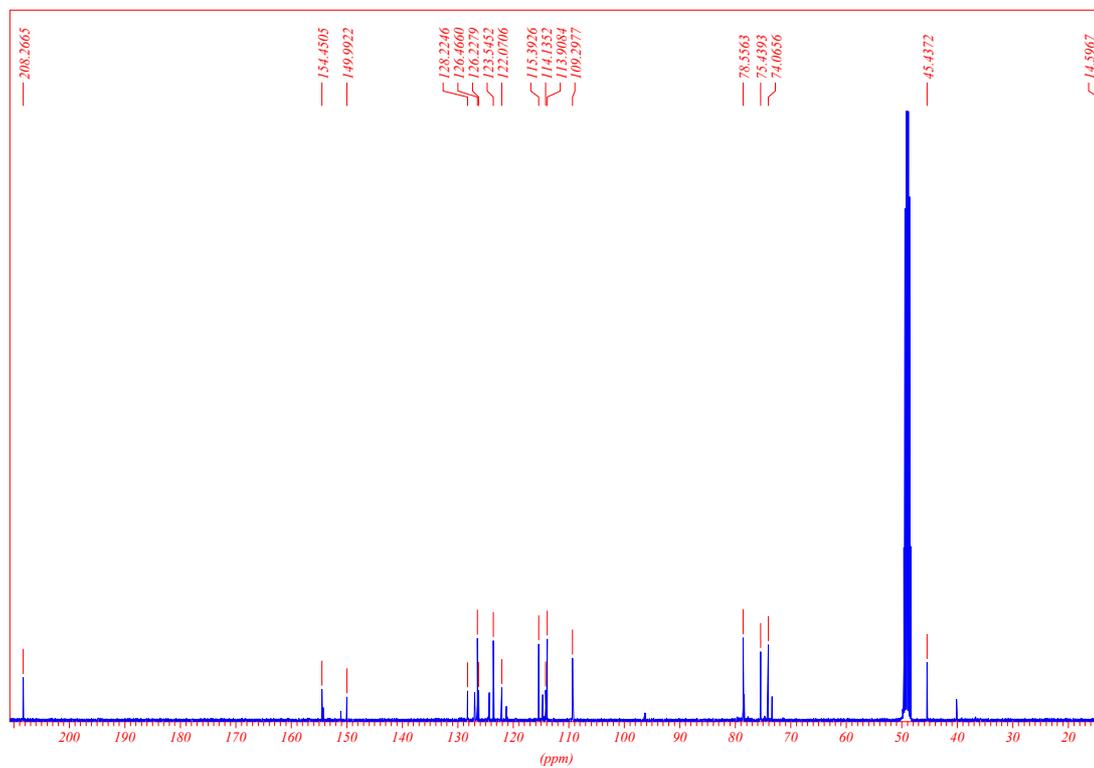
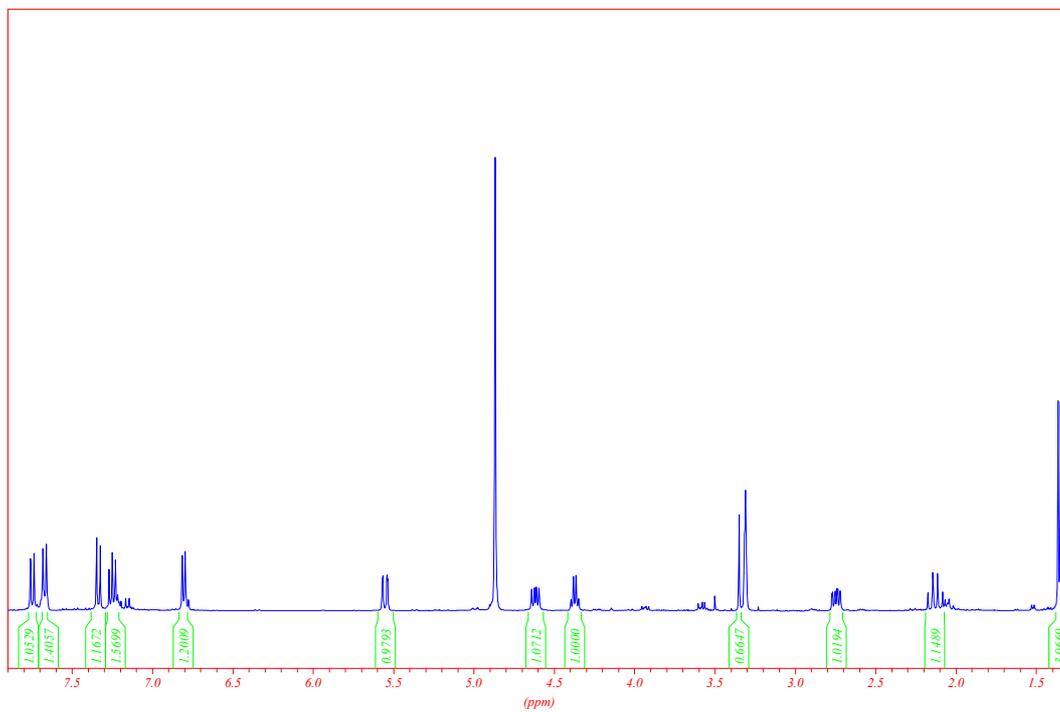
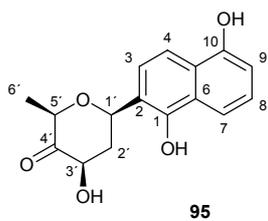


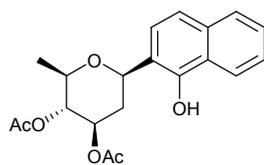




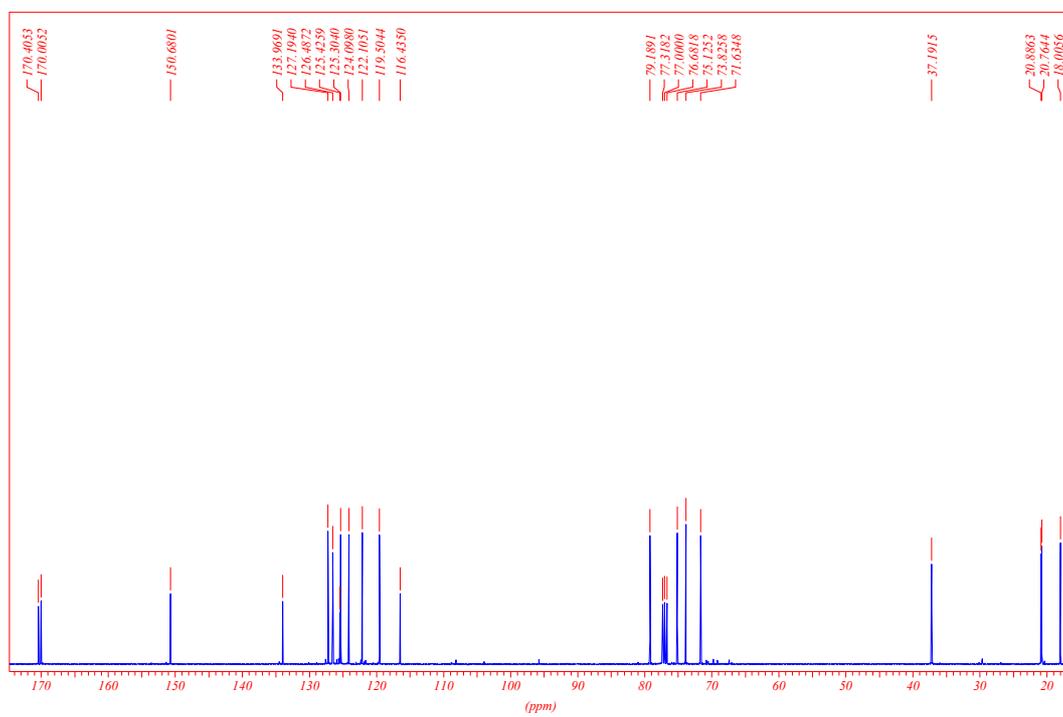
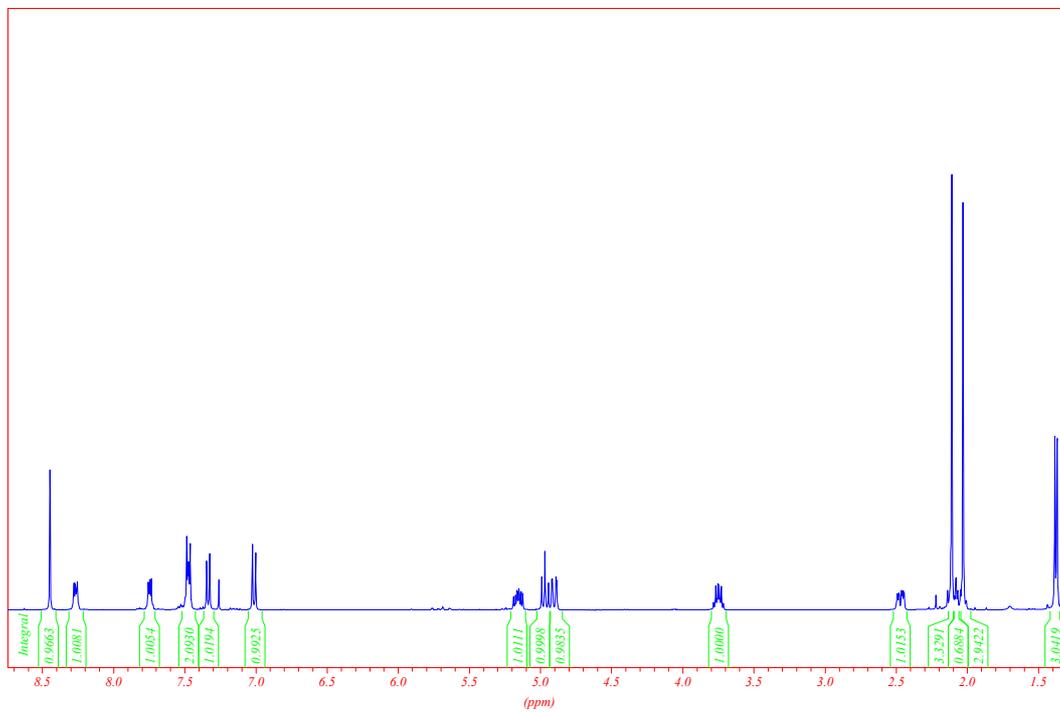


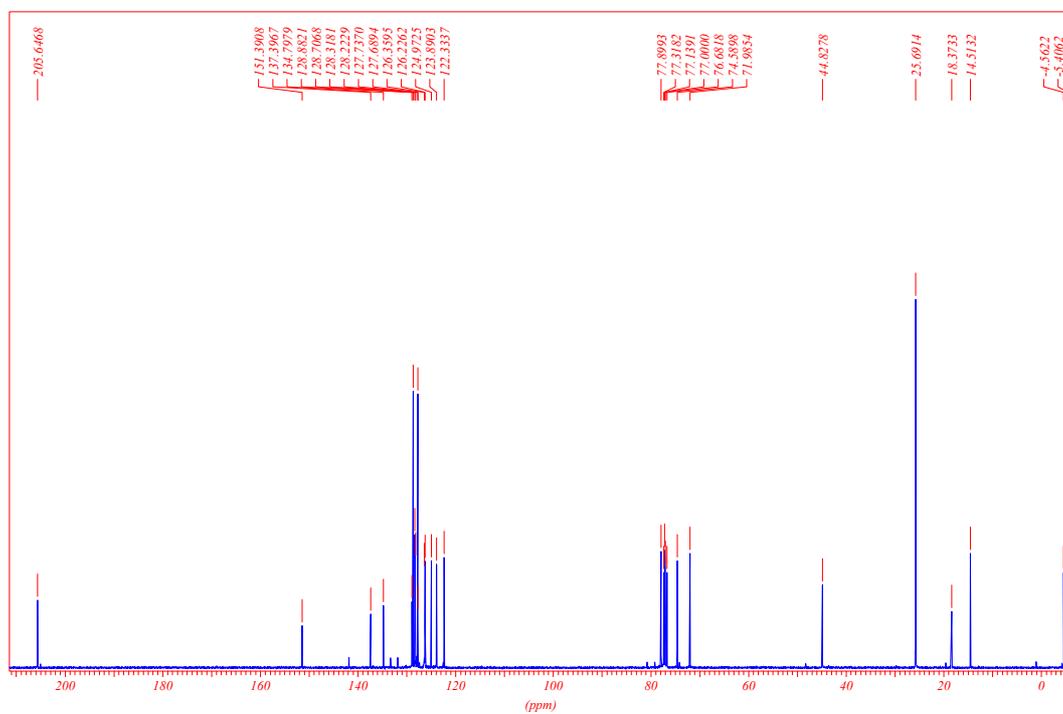
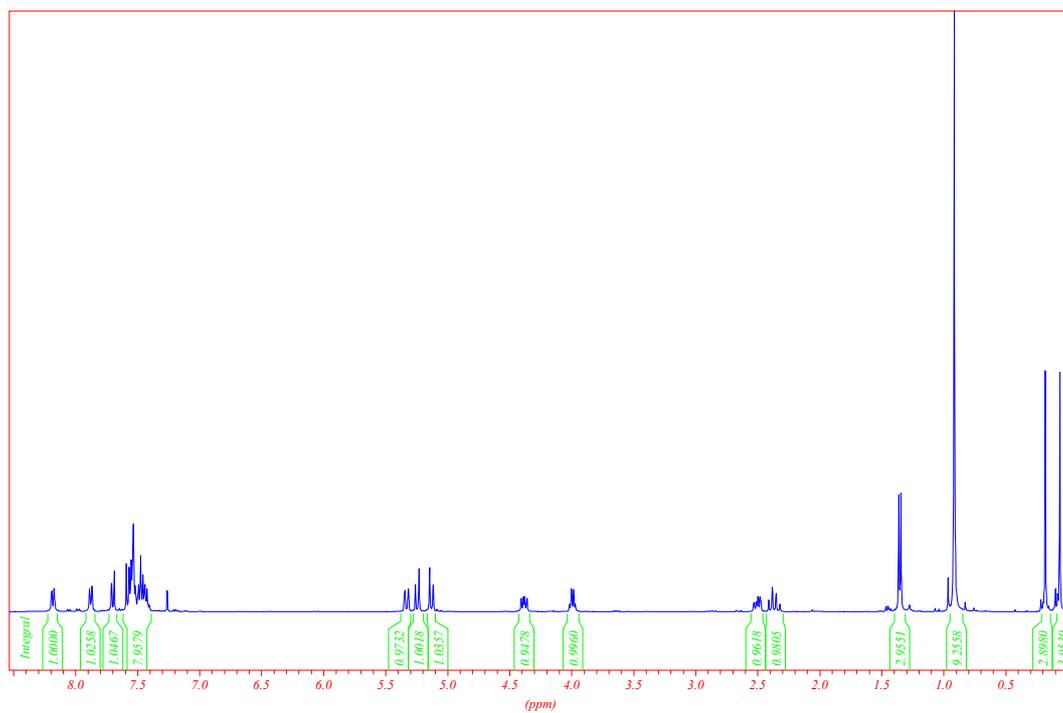
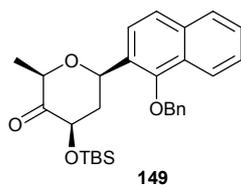


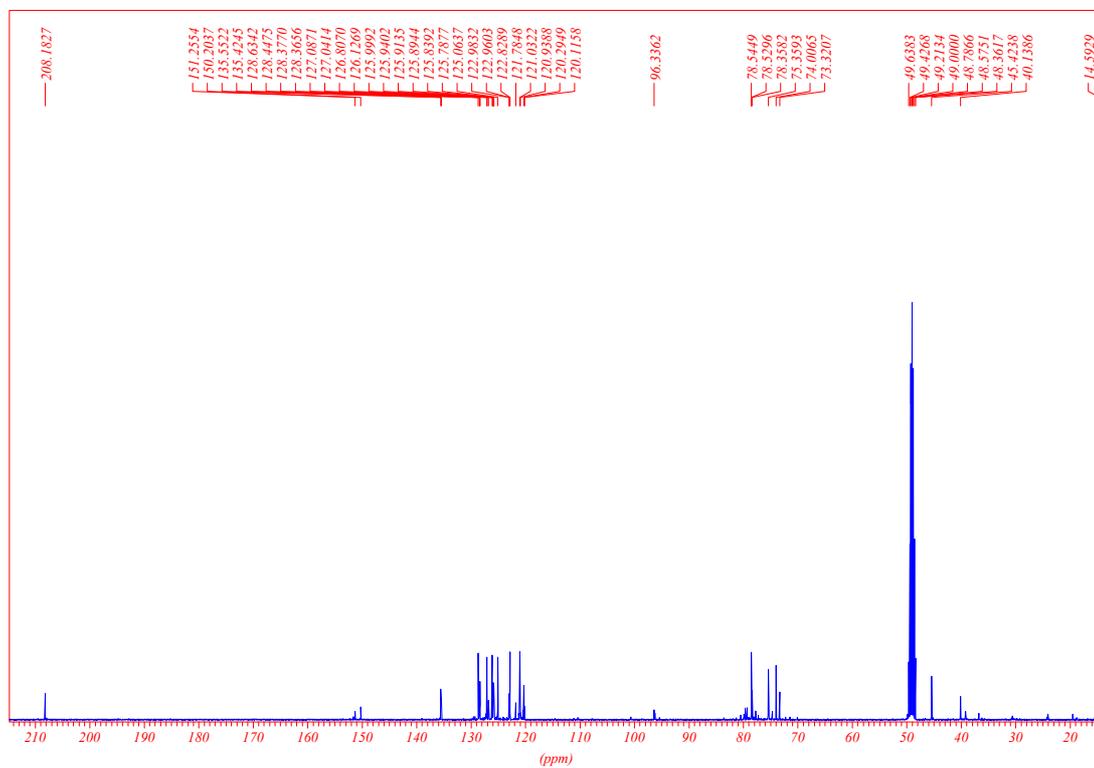
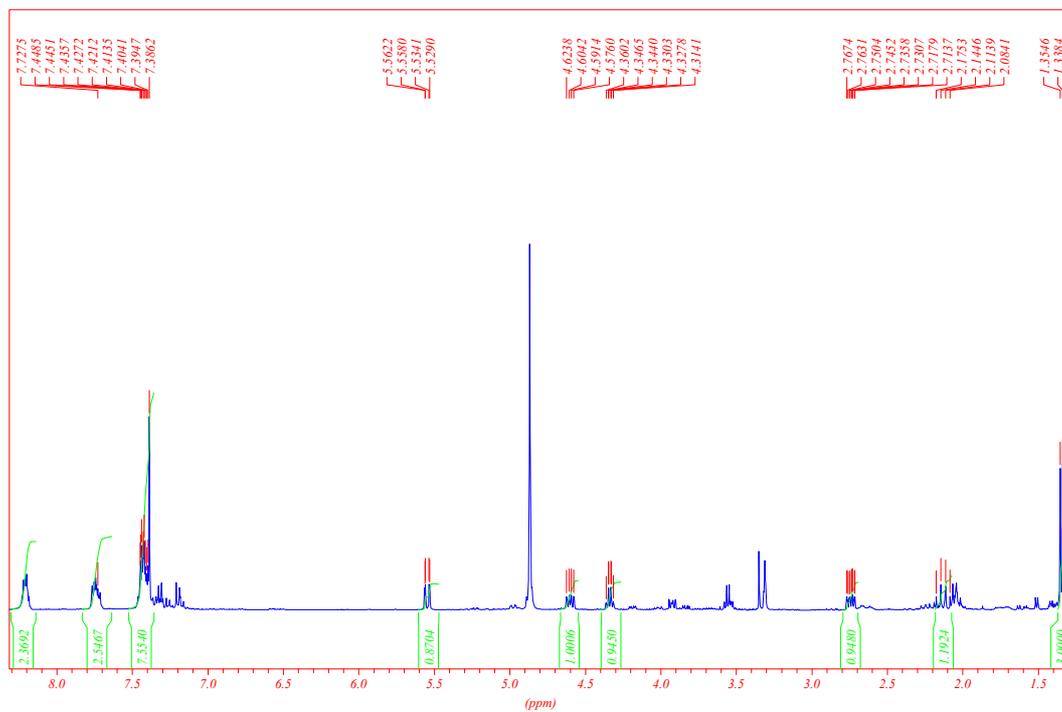
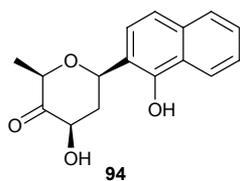


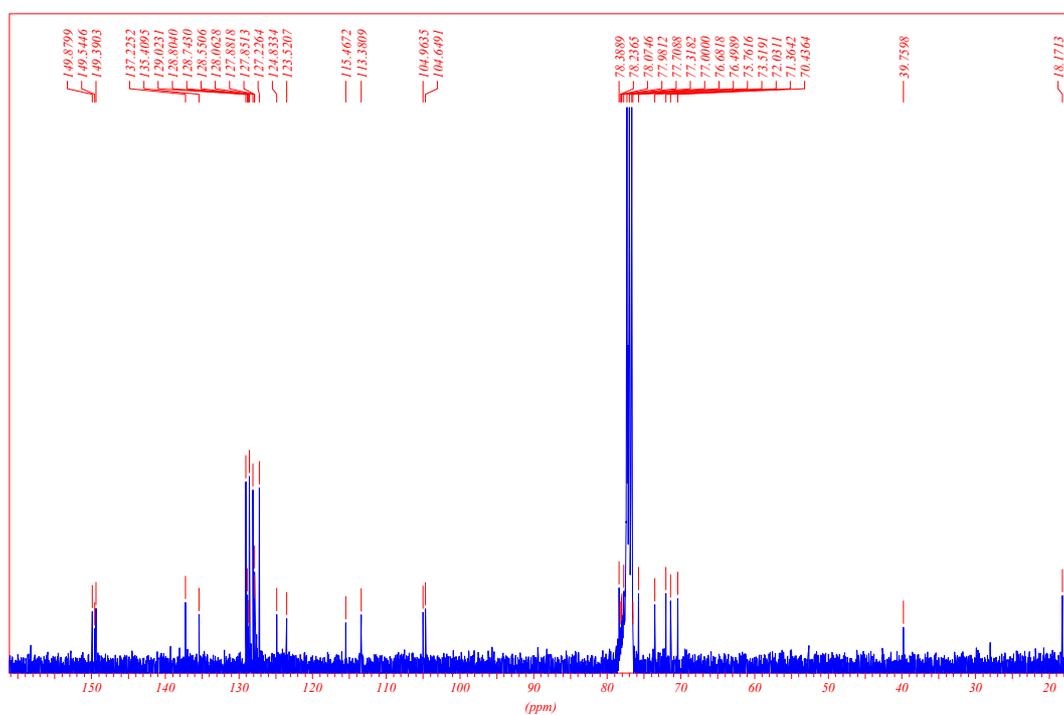
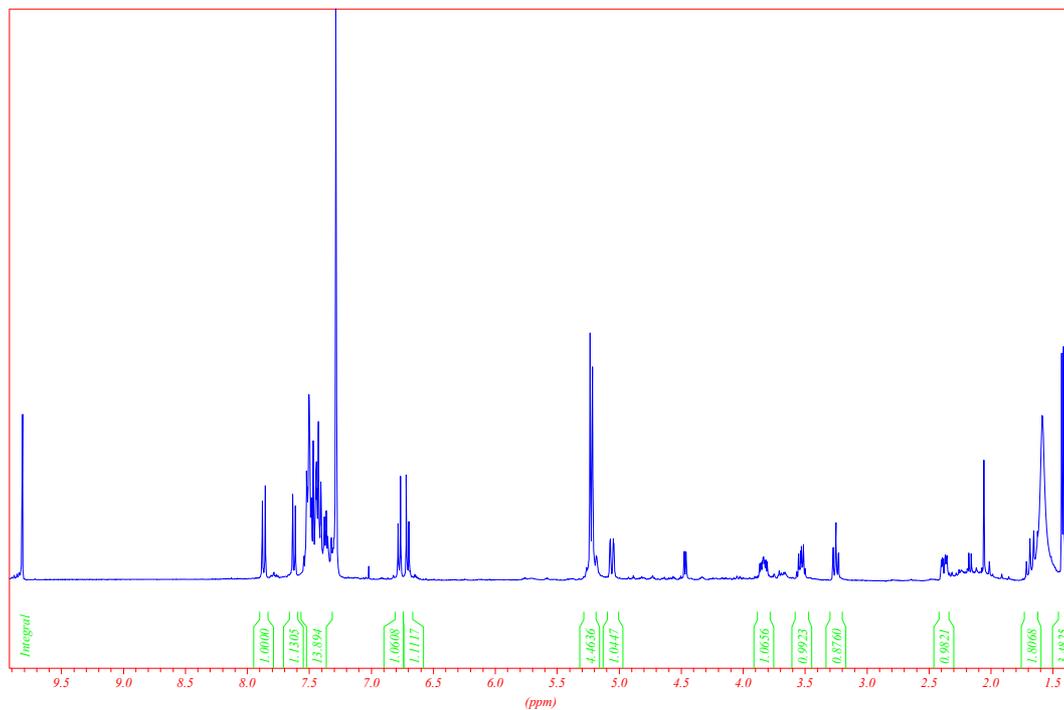
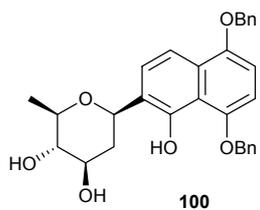


145









## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kirschning für die Überlassung dieser spannenden Themen, die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die Gewährung günstiger, unkomplizierter Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. H. Meyer danke ich für die Übernahme des Coreferats.

Herrn Dr. Dräger danke ich für die vielen hilfreichen Tipps, die konstruktiven Anregungen und das eine Auge, welches er „schnell mal“ auf die Spektren werfen konnte.

Weiterer Dank gilt meinen Arbeitskreiskollegen für die Schaffung einer wirklich angenehmen Atmosphäre hier innerhalb der Mauern des OCI und - nicht zu vergessen - auch darüber hinaus.

Ganz besonders ist die „Mannschaft“ des Labors 120, Sina Hartlieb und Silke Berski, zu erwähnen, ohne Euch wäre es wirklich die Einsiedelei gewesen. Viel Glück auf Eurem Weg!

Prof. Mike Boysen, Dr. Marco Brünjes, Dr. Eike Kunst, Martin Bock, Axel Meyer und vor allem Christof Kujat danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für konstruktive Kritik und auch für ausgesprochenes Lob.

Den Mitarbeitern der spektroskopischen Abteilungen, hier besonders zu erwähnen Dagmar Körtje, Monika Rettstadt und Rainer Nötel danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und das Aufnehmen der NMR- und MS-Spektren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinen Freuden, die mich fortwährend unterstützten und mich auch im fernen Hannover immer haben spüren lassen, dass das zu Hause nur einen Katzensprung entfernt ist. Besonders zu erwähnen sind hierbei auch Dr. Peter Güttler seine Frau Sabine, die immer an mich glaubten und mir zu Seite standen. Nicht zu vergessen sind Claudia Stolzenwald und Denis Hunjiak, die mich zur Patentante ihres, während dieser Arbeit geborenen Sohnes machten und mich so als festen Bestandteil ihrer Familie integrierten – wo auch immer es mich hinzieht.

Zu letzt aber ganz besonders zu erwähnen ist der Mensch, dem mit Abstand meine tiefste Dankbarkeit gilt: Axel Meyer.

Ohne seine positive Einstellung, seine ruhige Art und seine starken Schultern ich diese Arbeit niemals so hätte durchführen können.

Ich danke Dir aus tiefstem Herzen. Ich hoffe sehr, zum Ende deiner Arbeit und darüber hinaus ebenso für Dich da sein zu können, wie Du für mich jetzt.

## **Persönliche Daten**

Geb. am 12.07.1977 in Bielefeld

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

## **Schulische Bildung**

08/1990 – 05/1997 Rückert Gymnasium Berlin

27.05.1997 Allgemeine Hochschulreife

## **Studium und Promotion**

08/2002 – 05/2006 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Kirschning, Universität Hannover  
Titel: „Entwicklung einer polymergestützten Immobilisations- und  
Aufreinigungstechnik von Enzymen für Durchflussreaktoren und  
chemoenzymatische Studien am Granaticin.“

05.07.2002 Zuerkennung des Diploms

08/1999 – 07/2002 Hauptstudium der Chemie an der TU Berlin

11/2001 – 07/2002 Diplomarbeit: „Studien zur Fluoreszenzmarkierung von Peptiden mittels  
Olefinmetathesen“

25.08.1999 Zuerkennung des Vordiploms

10/1997 – 08/1999 Grundstudium

## **Berufliche Erfahrungen**

08/2002 – 03/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an Universität Hannover, Institut für  
Organische Chemie

10/1997 – 07/2002 Studentische Hilfskraft in der Fraunhofer Gesellschaft, Fraunhofer  
Verbund Mikroelektronik.