

**Hybrid-Chemoenzymatische Synthese
neuer 7-Desoxy-Sedoheptulose-Derivate als
Inhibitoren der 3-Dehydrochinat-Synthase**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Pascal Rath
aus Reutlingen

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

19.01.2024

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Stephanie Grond

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Martin E. Maier

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen von Dezember 2017 bis Februar 2022 unter der Anleitung von Prof. Dr. Stephanie Grond durchgeführt.

Inhalt

A. ALLGEMEINER TEIL.....	1
1. Einleitung.....	1
1.1 Problemstellung.....	1
1.2 Der Shikimatweg und die 3-Dehydrochinat-Synthase.....	2
1.3 Bekannte Inhibitoren der 3-Dehydrochinat-Synthase.....	4
1.4 Klassischer Zugang zu Ketoheptosen mittels chemischer Synthese	8
1.5 Die chemoenzymatische Synthese und das Enzym Transketolase.....	11
1.6 <i>Prodrugs</i> und <i>Propesticides</i>	14
1.7 <i>Molecular Docking</i> und das <i>Docking</i> Programm FITTED	16
1.8 Aufgabenstellung.....	21
2. 7-Desoxy-D-sedoheptulose (7dSh, 56) – erster einer neuen Wirkstoffklasse	23
2.1 Vorangegangene Arbeiten.....	23
2.2 Optimierung der chemoenzymatischen Synthese von 7dSh (56).....	27
2.3 Vollständige NMR-Charakterisierung und Strukturaufklärung von 7dSh (56).....	32
2.4 Strukturelle Aspekte neuer 7dSh Derivate	35
3. Synthese und Analytik von 7dSh (56) und dessen Analoga.....	37
3.1 Synthesestrategie A – Ribose als Startverbindung	37
3.2 Synthesestrategie B – Erzwingung der Pyranose-Form.....	41
3.3 Weitere Synthesen neuer 7dSh-Analoga.....	47
3.3.1 7-Desoxy-L-glucoheptulose (7dGh, 66)	47
3.3.2 COOH-7dSh (68).....	47
3.3.3 Perac-7dSh (69)	51
3.4 Bestimmung der Konformation von 7dSh (56) und dessen Analoga (63 – 68).....	54
4. Biologische Untersuchungen	58
4.1 <i>In vivo</i> Untersuchungen am Cyanobakterium <i>A. variabilis</i>	60
4.2 Biologische Untersuchungen an der Modellpflanze <i>A. thaliana</i>	64
4.2.1 <i>In vitro</i> Untersuchungen an <i>A. thaliana</i>	64
4.2.2 <i>In vivo</i> Untersuchungen an <i>A. thaliana</i>	73
4.3 Aufklärung der Biosynthese von 7dSh (56) über ¹³ C-markierte Verbindungen.....	78
5. <i>Molecular Docking</i>-Studie	79

6. Erklärung über den Rahmen der gemeinschaftlichen Arbeiten	88
7. Zusammenfassung und Ausblick	90
8. Summary and Outlook	95
9. Veröffentlichte Publikationen	99
B. EXPERIMENTELLER TEIL	100
10. Allgemeines	100
10.1 Chemikalien.....	100
10.2 Instrumentelle Analytik.....	100
10.3 Sonstige Geräte.....	102
11. Biologische Arbeiten	102
12. <i>Molecular Docking</i> Arbeiten.....	103
13. Allgemeine Arbeitsvorschriften	104
14. Spezielle Arbeitsvorschriften.....	106
14.1 Darstellung von 7dSh (56)	106
14.2 Darstellung von 7d7FSh (63)	111
14.3 Darstellung von 5,7dd5FIh (64)	115
14.4 Darstellung von 7d5MSh (65).....	123
14.5 Darstellung von 5,7ddGh (67).....	130
14.6 Darstellung von COOH-7dSh (68).....	137
14.7 Darstellung von Perac-7dSh (69).....	139
14.8 Darstellung von 7dGh (66).....	141
14.9 Darstellung von ¹³ C ₅ -7dSh (56*).....	142
14.10 Darstellung von Hydroxypyruvat (46).....	147
14.11 NMR-spektroskopische Analyse von DAHP (3).....	148
Abkürzungsverzeichnis	149
Literaturverzeichnis	153

A. Allgemeiner Teil

1. Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Weltbevölkerung nimmt jährlich zu. Prognosen gehen davon aus, dass 2050 ca. 10 Milliarden Menschen auf der Erde leben.^[1] Dies hat gravierende Folgen für die Landwirtschaft, welche international bewältigt werden müssen. So nimmt durch die Zunahme der Bevölkerung auch die bebaute Fläche zu, was im Umkehrschluss die vorhandenen Ackerbauflächen reduziert. Um die landwirtschaftlich produzierte Nahrungsmenge zu erhalten, oder gar zu erhöhen, muss der Ernteertrag maximiert werden. Die genutzten Kulturpflanzen konkurrieren hierbei mit unerwünschten Unkräutern um Sonnenlicht, Wasser, Raum und Bodennährstoffe.^[2] Zu Beginn der Unkrautbekämpfung wurde diese ausschließlich mechanisch von Hand oder mittels landwirtschaftlicher Maschinen und Geräte umgesetzt, was jedoch schnell an Grenzen stieß. In den 1940er Jahren wurde erstmals im größeren Stil mittels chemischer Herbizide, wie den Phenoxy-carbonsäuren, Unkrautbekämpfung betrieben.^[3] Das heutzutage bekannteste und meist genutzte Herbizid ist Glyphosat. Es ist seit den 1970er Jahren auf dem Markt und wird als Hauptwirkstoff im Markenprodukt ROUNDUP vertrieben. Unter ROUNDUP werden verschiedene Breitbandherbizide angeboten, wobei sich die Formulierung, bezogen auf Glyphosatkonzentration, Gegenion und weitere Beimittel (z.B. Netzmittel) unterscheidet. Netzmittel dienen hierbei der besseren Anhaftung der eingesetzten Lösung an der Blattoberfläche. Seit vielen Jahren wird die Anwendung von Glyphosat als Herbizid kontrovers diskutiert, so hatte die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC) 2015 Glyphosat als „wahrscheinlich krebserregend für den Menschen“ deklariert. Dies wurde jedoch durch keine andere Organisation bestätigt und im selben Jahr durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) als „unwahrscheinlich“ erachtet. Weitere Organisationen negierten die krebserregenden Eigenschaften sogar. Nichtsdestotrotz gibt es eine Fülle weiterer kontroverser Themen im Zusammenhang mit Glyphosat und ROUNDUP, so werden beispielsweise bestimmte Zusätze als „bedenklich“ eingestuft.^[4] Des Weiteren konnten im EU Report von 2016 in 3,6 % aller getesteten Lebensmittel (6761 Proben) quantifizierbare Mengen Glyphosat nachgewiesen werden. Die maximal zulässige

Menge wurde jedoch lediglich in 19 Proben (0,28 %) überschritten.^[5] Zudem konnte Glyphosat bei schwangeren Frauen im Blut, sowie geringe Mengen in der Nabelschnur Neugeborener nachgewiesen werden, wobei die nachweisbare Menge mit den Lebensumständen der Frauen zusammenhing. Arbeitete die Frau als Landwirtin oder arbeitete ein Familienmitglied in der Landwirtschaft, war die nachweisbare Menge an Glyphosat um ein Vielfaches höher. Es konnte jedoch kein direkter negativer Effekt festgestellt werden.^[6] Insgesamt ist die Studienlage, trotz ihrer großen Anzahl, uneindeutig, was zu einer kontroversen Betrachtung von Glyphosat in der Politik, in der Öffentlichkeit und auch in der Wissenschaft führt.

Jährlich werden ca. fünf Millionen Kilogramm Glyphosat in Deutschland verwendet. Dies entspricht in etwa einem Drittel der gesamt genutzten Herbizidmenge. 40 % des Ackerlandes werden mit Glyphosat behandelt.^[4] Die Zulassung für Glyphosat in der Europäischen Union endete am 15.12.2022. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit und die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) waren jedoch aufgrund des umfangreichen Sachverhaltes bis zu diesem Zeitpunkt nicht in der Lage eine schlussendliche Bewertung durchzuführen. Aufgrund dessen wurde in der Durchführungsverordnung 2022/2364 die Zulassung von Glyphosat bis zum 15.12.2023 verlängert.^[7]

Die Erforschung alternativer herbizider Wirkstoffe ist ein dringendes Thema, nicht nur um Glyphosat zu ersetzen, sondern auch die Biodiversität mit mehr Möglichkeiten aufrecht zu erhalten.

1.2 Der Shikimatweg und die 3-Dehydrochinat-Synthase

Der Shikimatweg ist ein Stoffwechselweg welcher sieben Enzyme umfasst. Er kommt ausschließlich in Pflanzen, Bakterien, Pilzen und Apicomplexa (einzellige eukaryotische Parasiten) vor, nicht aber in Tieren. Er dient der Biosynthese aromatischer Verbindungen, wie beispielsweise den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.^[8] Startpunkt dieses Stoffwechselweges sind die beiden Substrate Erythrose-4-phosphat (**1**) und Phosphoenolpyruvat (PEP, **2**), welche innerhalb von sieben Schritten zu Chorismat (**9**) umgesetzt werden (Abb. 1). Die Abwesenheit des Shikimatweges in Tieren macht ihn zu einem interessanten Angriffspunkt bei der Entwicklung von Herbiziden und Antibiotika. Bekanntester und zugleich umstrittenster inhibitorischer Vertreter ist das nahezu weltweit

genutzte Breitbandherbizid Glyphosat. Es hemmt die 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase, das sechste Enzym des Shikimatweges.^[9]

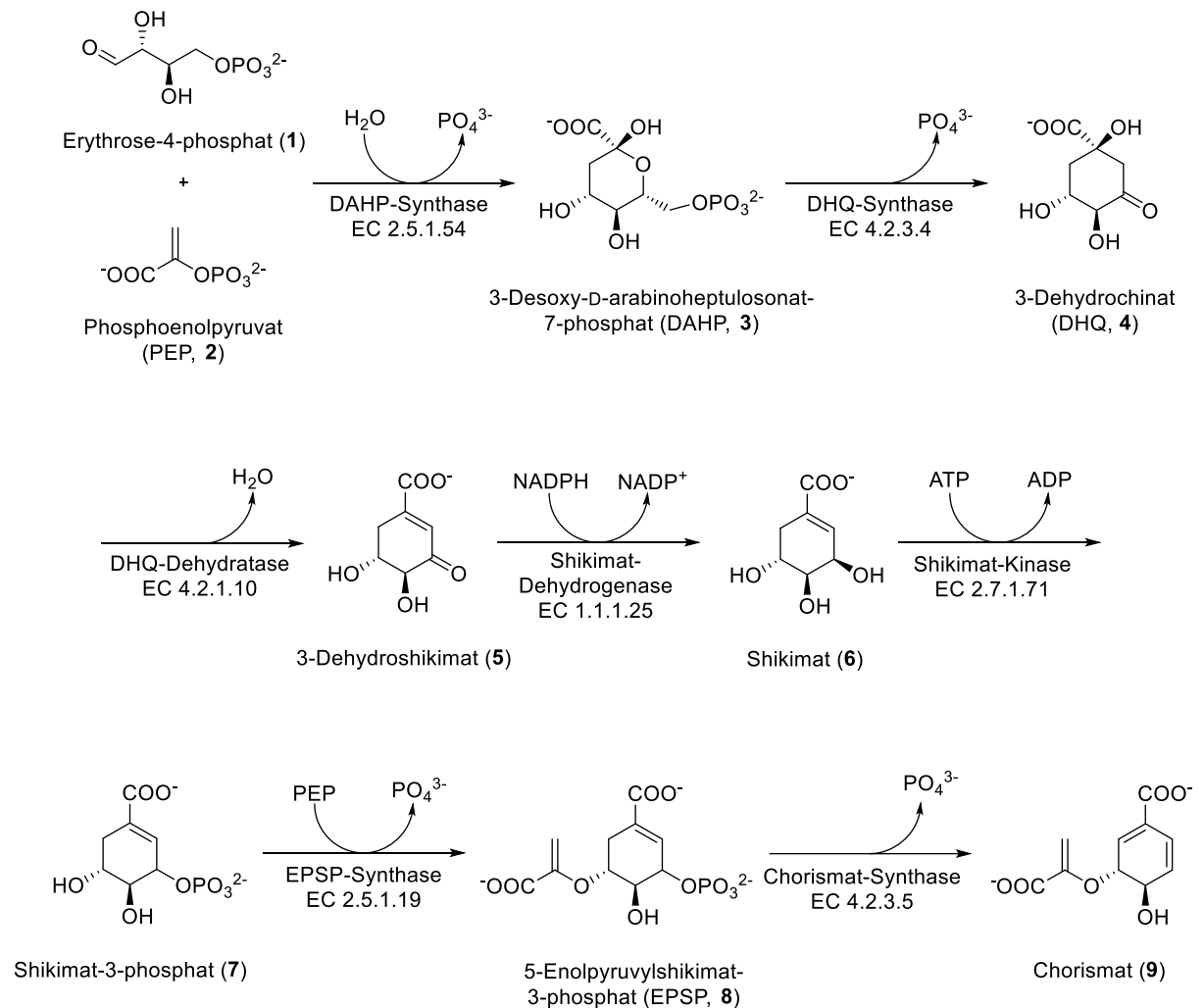


Abbildung 1: Syntheschema des Shikimatweges ausgehend von Erythrose-4-phosphat (1) und Phosphoenolpyruvat (PEP, 2) über Shikimat (6) zu Chorismat (9); mit allen beteiligten sieben Enzymen.

Ein weiteres potenzielles Enzym für die Entwicklung von Antimetaboliten ist die 3-Dehydrochinat-Synthase (DHQS), welche an zweiter Stelle im Shikimatweg anzutreffen ist. Ein Antimetabolit ist eine Verbindung, die dem eigentlichen Substrat einer enzymatischen Reaktion ähnelt, jedoch von diesem Enzym nicht umgesetzt werden kann und somit den Stoffwechselweg hemmt.^[10] Die DHQS katalysiert die Umsetzung von 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat (DAHP, 3) zu 3-Dehydrochinat (DHQ, 4). Die Umwandlung des Oxazyklus zum Carbozyklus findet dabei in fünf Schritten statt (Abb. 2).^[11] Im ersten Schritt findet eine NAD⁺-abhängige Oxidation der Hydroxylgruppe an C-5 statt. Neben NAD⁺ ist ein divalentes Kation zur Stabilisierung essenziell, beispielsweise Zn²⁺ oder Co²⁺, abhängig von der biologischen Herkunft der DHQS. Der zweite Schritt umfasst eine β -Eliminierung von anorganischem Phosphat, begünstigt durch die Wechselwirkungen in der

$(K_i = \frac{[Enzym] \cdot [Inhibitor]}{[Komplex]}$ mit $[x]$: Konzentration von x). Ein niedriger K_i -Wert steht somit für eine starke Bindungsaffinität.^[16-17] Entwickelt wurde das Carbaphosphonat (**C1**, **10**) ausgehend von der Idee, die β -Eliminierung des Phosphats zu verhindern. Als Zwischenschritt auf dem Weg zu diesen Inhibitoren wurden als erstes DAH-phosphonat-Analoga (z.B. **11**) synthetisiert, bei welchen jedoch die Gefahr einer Furan-Bildung aufkam, was im Gegensatz zur Pyranose-Form des natürlichen Substrates (DAHP, **3**) stand. Die mögliche Ausbildung der Furanose- und Pyranose-Form (**11a** und **11c**), ausgehend von der Offenkettigen-Struktur (**11b**) ist Abbildung 3 zu entnehmen. Deshalb wurden 2-Desoxy-DAH-phosphonat-Analoga (z.B. **12**) synthetisiert, welche eine mögliche Öffnung des 6-Rings verhindern sollten. Diese 2-Desoxy-Abkömmlinge zeigten eine geringere inhibitorische Aktivität (K_i : 0 bis $1,3 \times 10^{-4}$ M) als die DAH-phosphonat-Analoga (K_i : 0 bis $8,0 \times 10^{-7}$ M).^[18-20] Die darauffolgende Idee, den Pyranosyrling-Sauerstoff durch ein Kohlenstoffatom auszutauschen, führte daraufhin zum erwähnten Carbaphosphonat (**C1**, **10**) und seinen Analoga. Diese Gruppe an neuen Inhibitoren hatten sowohl eine feste 6-Ring Form als auch häufig eine um mehrere Potenzen höhere inhibitorische Aktivität. Die bessere Aktivität wurde dem geänderten Redoxpotential an C-5, im Vergleich zu den oxazyklischen Verbindungen, zugesprochen. Aufgrund des fehlenden Heteroatoms in α -Position zu C-5 (fehlender Pyranosyrling-Sauerstoff) sei eine bessere Stabilisierung der Ketogruppe nach Ablauf des ersten Schrittes gewährleistet, was eine stärkere Bindung des Inhibitors in der aktiven Tasche bewirken sollte.^[14] Diese Theorie wird zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel 4.2) noch in Frage gestellt.

Die inhibitorische Aktivität des ursprünglichen Carbaphosphonates (**C1**, **10**) konnte trotz hohem Forschungsaufwand und einer Vielzahl an synthetisierten Derivaten erst 1997 übertroffen werden. Die Einführung einer Doppelbindung erbrachte die Lösung. Die Verbindung Cyclohexenylphosphat (**13**), mit einer endocyclischen Doppelbindung, besitzt als einziges Derivat, trotz Phosphat Gruppe, eine bessere Aktivität (K_i : $1,2 \times 10^{-10}$ M, *E. coli*) als jedes andere bisher synthetisierte Derivat. Durch diese Erkenntnis konnten weitere hochaktive Derivate dargestellt werden, die eine ähnliche Aktivität zu **C1** besitzen. Hierbei konnte die eingeführte Doppelbindung sowohl endo- wie auch exocyclisch vorliegen (**14** – **16**). Begründet wurden die Aktivitäten mit der Imitierung eines Zeitpunktes im Verlaufe des zweiten Schrittes (β -Eliminierung von anorganischem Phosphat) der DHQS-Reaktion. Ob es sich hierbei nun um eine vollwertige Zwischenstufe einer Elcb-Reaktion handelt oder lediglich um einen Übergangszustand ist nicht geklärt.^[21]

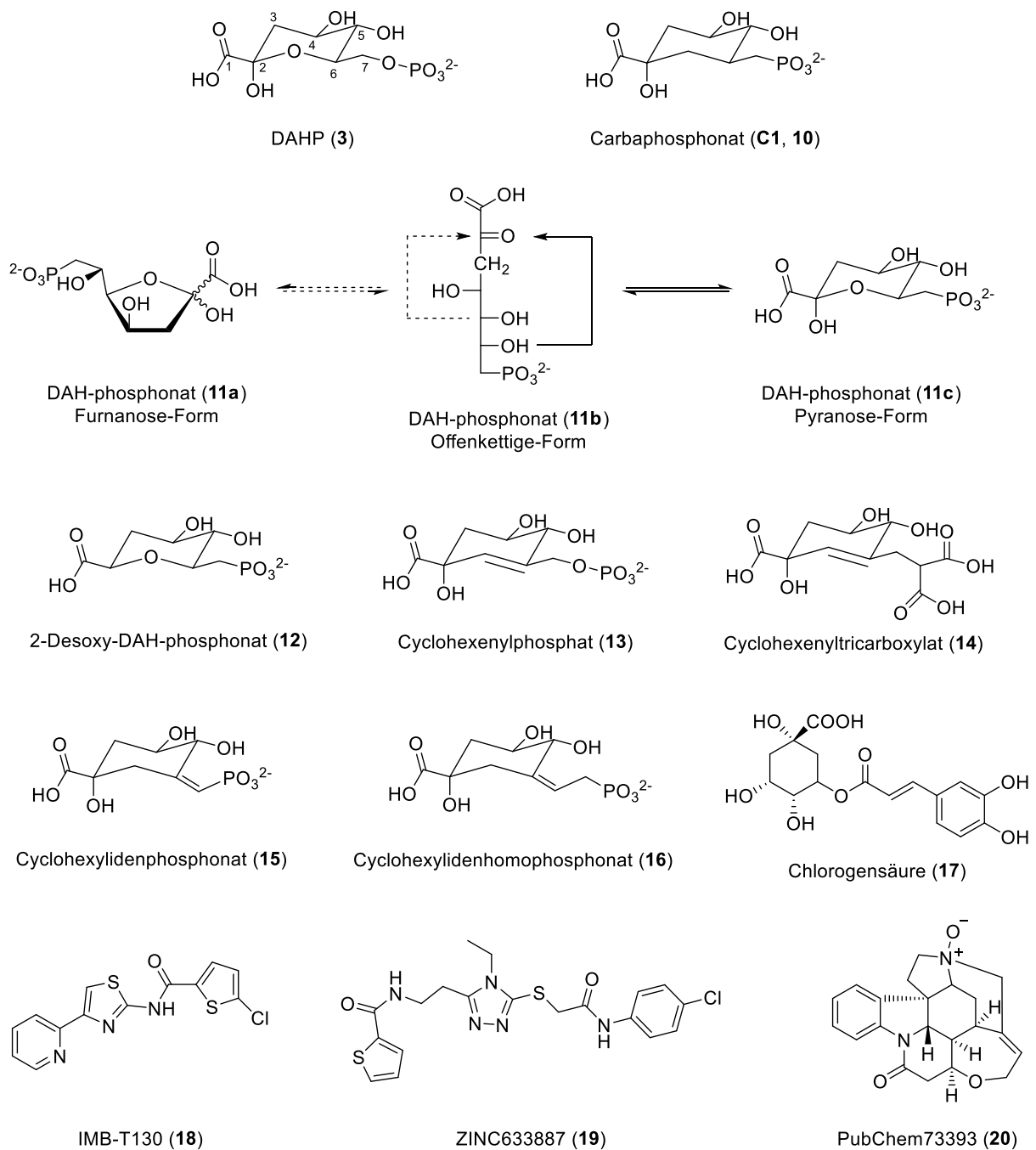


Abbildung 3: Überblick zu den Konstitutionen literaturbekannter Inhibitoren der DHQS (10 – 20). Zum strukturellen Vergleich ist DAHP (3) als Substrat der DHQS ebenfalls abgebildet.

Trotz ihrer ungeschlagenen *in vitro* Aktivität besitzen die Carbaphosphonate nahezu keine *in vivo* Aktivität, was das Hauptproblem dieser Inhibitorgruppe darstellt. In den wenigen literaturbekannten Untersuchungen konnte bei keiner der getesteten Pflanzenspezies ein typischer, herbizider Effekt, wie beispielsweise reduziertes Frischgewicht, Verfärbung der Blätter oder Austrocknung, festgestellt werden. Lediglich eine 40-fache Akkumulation von DAH, dem dephosphorylierten Substrat der DHQS, konnte bestimmt werden, was jedoch keinen Einfluss auf das Pflanzenwachstum hatte. Die Quantifizierung von DAH als

Zerfallsprodukt von DAHP bietet sich hier als valide Methode zur Quantifizierung dieses Metaboliten an.^[18]

Weitere DHQS-Inhibitoren, mit geringerem Forschungsumfang, sind ebenfalls bekannt. Ein Vertreter ist die Chlorogensäure (**17**), welche allgemein für ihre antibakteriellen Eigenschaften bekannt ist. Sie ist ein Ester aus der Kaffee- und Chinasäure, wobei im Falle der Carbaphosphonate die Chinasäure häufig als Ausgangsmaterial für die Synthese dient. In *in vitro* Enzymstudien aus dem Jahre 2020 an der DHQS von *Providencia*, einem gramnegativen Bakterium, konnte ein K_i -Wert von $235 \pm 21 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Des Weiteren wurden *in vivo* Tests an verschiedenen grampositiven und gramnegativen Bakterien durchgeführt. Hierbei konnten MIC-Werte zwischen 60 und 100 μM gemessen werden. Auf Basis zusätzlicher *Docking*-Studien zeigte sich, dass Chlorogensäure (**17**) das Substrat im aktiven Zentrum ersetzt, jedoch aufgrund des großen Kaffeesäurerestes keine geschlossene Konformation des Proteins möglich ist.^[22] Der MIC-Wert beschreibt die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei welcher *in vitro* ein sichtbares Wachstum eines Mikroorganismus vollständig unterbunden wird.^[23]

Ein weiterer Vertreter ist die Verbindung IMB-T130 (**18**), welche in einer Studie von 2018 Aktivität gegen das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* zeigte. *In vitro* Aktivitätsstudien an der isolierten DHQS ergaben einen IC_{50} -Wert von 2,7 μM . Der IC_{50} -Wert beschreibt hierbei im Gegensatz um K_i -Wert die Konzentration eines Inhibitors, bei der *in vitro* die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms nur noch halbmaximal ist.^[17] Der Zusammenhang zwischen K_i - und IC_{50} -Wert wird in Kapitel 4.2.1 näher betrachtet. Zusätzliche *Docking*-Studien bekräftigen die Annahme, das IMB-T130 (**18**) im aktiven Zentrum der DHQS bindet. Weitere *in vivo* Tests ergaben MIC-Werte zwischen 80 und 300 $\mu\text{g/L}$, abhängig vom jeweiligen Bakterium. Pharmakologische Studien an Ratten wurden ebenfalls durchgeführt, wobei lediglich die Verträglichkeit bei oraler beziehungsweise intravenöser Verabreichung untersucht wurde. Erste Studien an Monozyt-Macrophagen aus Mäusen zeigen jedoch eine dosisabhängige Inhibierung von *Mycobacterium tuberculosis*.^[24]

In einem weiteren Beispiel aus 2018 wurden mittels einer groß angelegten *Docking*-Studie 12165 Verbindungen aus den zwei öffentlichen Datenbanken „ZINC“ und „PubChem“ untersucht, wobei die zwei Verbindungen ZINC633887 (**19**) und PubChem73393 (**20**) stabile Komplexe mit der DHQS aus *Mycobacterium tuberculosis* ausbildeten. Ein wichtiger Faktor ist, dass die beiden Verbindungen nicht nur den Platz des eigentlichen Substrates, sondern

ebenfalls den von NAD^+ einnehmen. *In vitro* oder gar *in vivo* Studien zu diesen beiden Verbindungen wurden zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht publiziert.^[25]

1.4 Klassischer Zugang zu Ketoheptosen mittels chemischer Synthese

Ketoheptosen, welche Schlüsselverbindungen dieser Arbeit darstellen, sind Monosaccharide, welche aus sieben Kohlenstoffatome aufgebaut sind und zur Gruppe der Ketosen zählen. Neben den Ketoheptosen existieren ebenso auch Aldoheptosen, welche analog aus sieben Kohlenstoffatome aufgebaut sind, jedoch aufgrund der Aldehydfunktion zur Gruppe der Aldosen gehören. Die allgemeine Summenformel der Heptosen ist $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_7$. Die Nomenklatur von Ketoheptosen leitet sich zumeist von den jeweiligen Aldoheptosen ab, wobei eine Kettenverlängerung an C-1 stattfindet, wodurch die Aldehydfunktion zur Ketofunktion wird. Diese Nomenklatur beschränkt sich jedoch lediglich auf 2-Ketoheptosen. Ist die Ketogruppe an einer anderen Position im Molekül ist die Namensgebung komplexer. Manche Ketoheptosen besitzen zusätzlich auch noch Trivialnamen. Zudem tragen die Ketoheptosen im Gegensatz zu den Aldoheptosen den Namenssuffix: -heptulose. Ein wichtiger Vertreter ist D-Mannoheptulose (**22**), welche aus Avocado extrahiert werden kann, sowie D-Sedoheptulose (D-Altroheptulose, **23**) aus dem Pentosephosphatweg (Abb. 4). Die Nomenklatur der Aldoheptosen ist komplexer, da diese im Vergleich zu Hexosen ein weiteres chirales Zentrum besitzen. Dieses chirale Zentrum wird über den Namenspräfix „D/L-glycero“ berücksichtigt und beschreibt die Konfiguration an C-6. Der restliche Name wird analog zu den Ketoheptosen von den Aldoheptosen abgeleitet. Aldoheptosen, wie beispielsweise L-Glycero-D-mannoheptose (**24**), sind häufig Bestandteil von Lipopolysacchariden (Abb. 4).^[26-27]

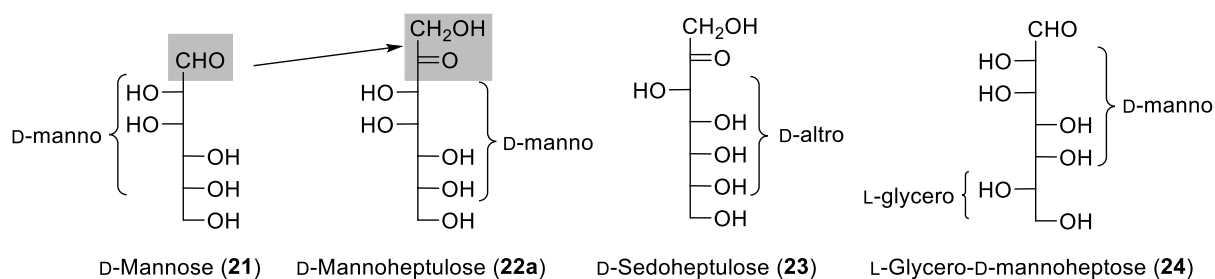


Abbildung 4: Nomenklatur bekannter Keto- und Aldoheptosen.

Die chemische Totalsynthese von Ketoheptosen umfasst, abhängig von der jeweiligen Herangehensweise, eine Vielzahl an Syntheseschritten. Allgemein existieren zwei verschiedene synthetische Wege zur Darstellung von Heptulosen, entweder über eine

Umlagerung oder über die Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts. Diese beiden Wege sind jedoch lediglich für die Darstellung von Manno- und Glucoheptulosen (**22**, **26**) geläufig. Eine der ersten Umlagerungen zur Synthese von Heptulosen ist die LOBRY-DE-BRUYN-ALBERDA-VAN-EKENSTEIN-Umlagerung, welche über eine baseninduzierte Enol-Bildung von einer Aldose zu einer Ketose umlagert. Abhängig von den Reaktionsbedingungen, ist hier jedoch eine Rückreaktion möglich, welche eine Epimerisierung des C-2-Stereozentrums zur Folge hat (Abb. 5A). Aufgrund der möglichen Epimerisierung wird diese Reaktion heutzutage zumeist nicht mehr angewendet.^[28-30] Eine weitere Umlagerung ist die AMADORI-Umlagerung, bei der nach Einführung eines Amines am C-1 einer Aldoheptose (**25b**) durch Umlagerung eine 1-Amino-ketoheptulose (**28**) gebildet wird (Abb. 5B). Eine dritte Umlagerung ist die BILIK-Umlagerung, welche aus 2-C-(Hydroxymethyl)-D-mannose/-glucose (**28**, **29**) in Molybdänsäure bei 80 °C die jeweiligen Heptulosen (**22b**, **26b**) bildet (Abb. 5C). Hierbei muss jedoch zuerst über zwei Vorstufen das genannte Edukt generiert werden.^[28]

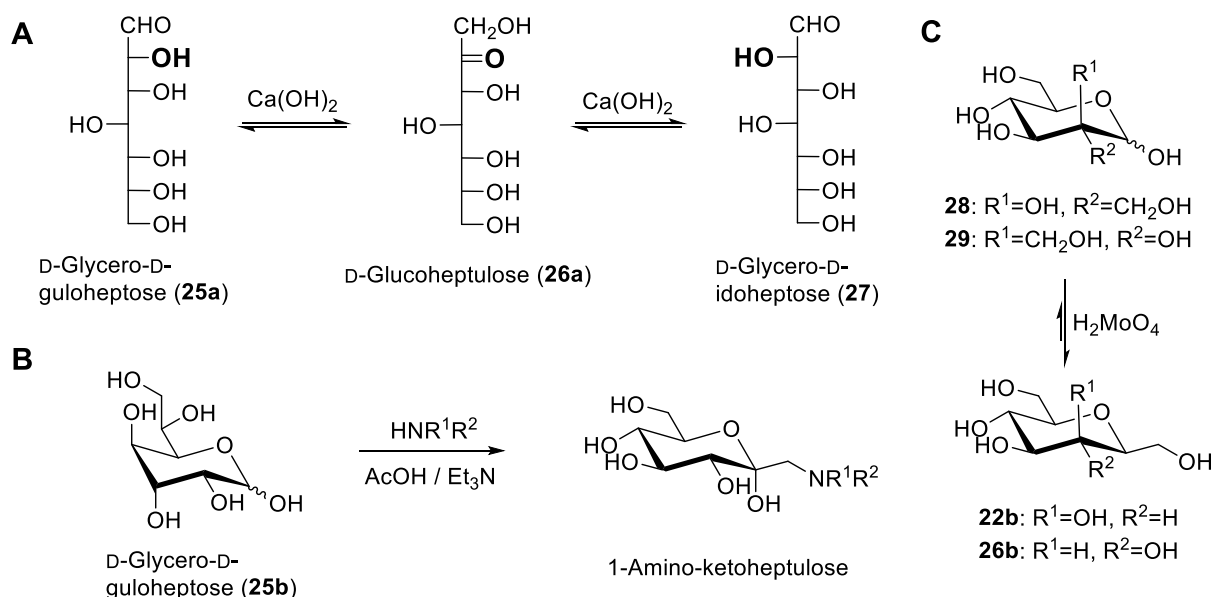


Abbildung 5: Syntheseüberblick literaturbekannter Zugänge zu Ketoheptosen über Umlagerungen. A) LOBRY-DE-BRUYN-ALBERDA-VAN-EKENSTEIN-Umlagerung. B) AMADORI-Umlagerung. C) BILIK-Umlagerung.

Die zweite grundlegende Strategie zu Heptulosen, die Verlängerung des Kohlestoffgerüsts, ist in der heutigen Literatur häufiger vertreten. Hierbei findet klassisch eine Verlängerung der Aldohexose an C-1 statt. Variante 1 (Abb. 6A) geht hierbei über den freien Aldehyd (**30**), wobei die erste Stufe der Kettenverlängerung eine WITTIG-Reaktion umfasst, um ein endständiges Olefin (**31**) zu generieren. Oxidation mit Kaliumpermanganat führt zu einem 2-Hydroxy-oxiran (**32**). Unter saurer Katalyse findet die Oxiranöffnung statt, was zum α -Ketol (**33**) führt.^[31] Synthesevariante 2 (Abb. 6B) geht über einen exocyclischen Enolether

vom Typ **36** oder **40**. Dieser Enolether wird durch Oxidation des Halbacetals (**34**, **38**) zum Lacton (**35**, **39**) und anschließender Methylierung, beispielsweise über eine WITTIG-Reaktion oder mit Hilfe des TEBBE- oder PETASIS-Reagenzes, hergestellt. Die anschließende Dihydroxylierung mit Osmiumtetroxid ergibt die geschützte Ketoheptose (**37**, **41**).^[32]

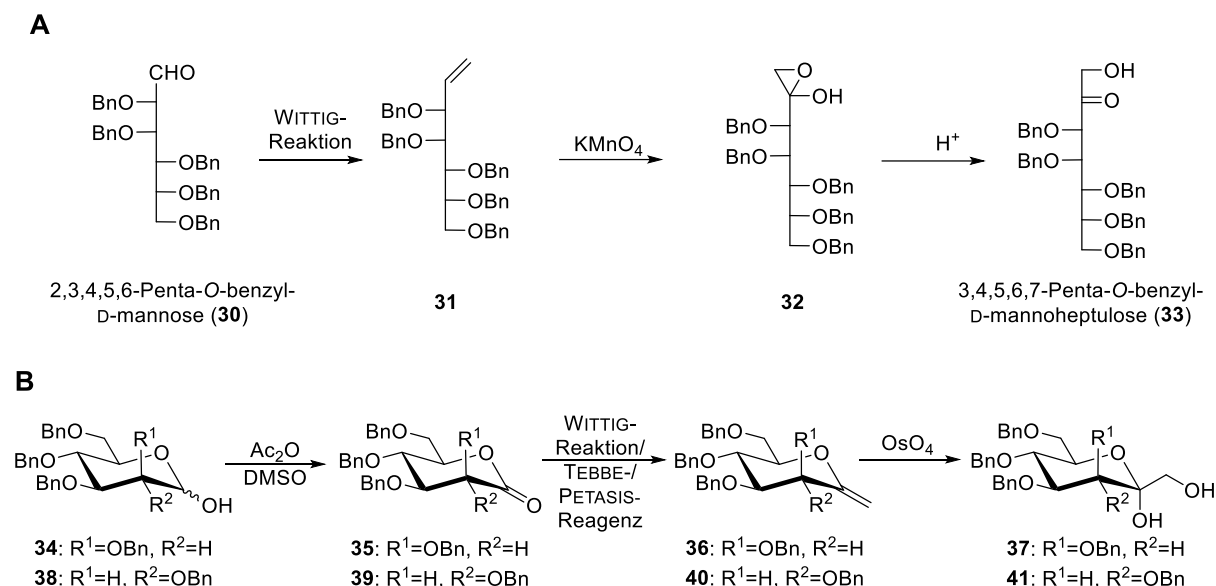


Abbildung 6: Syntheseüberblick literaturbekannter Zugänge zu Ketoheptosen über eine Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts. A) Synthesevariante 1 geht über eine offenkettige Verlängerung. B) Synthesevariante 2 hingegen über die Pyranose-Form.

Zusammenfassend existieren mehrere Möglichkeiten der chemischen Totalsynthese von Heptulosen und deren Derivaten. Die meisten literaturbekannten Synthesewege sind jedoch lediglich für die Darstellung von Manno- und Glucoheptulosen (**22**, **26**) geläufig oder bekannt. Abhängig von der jeweiligen Herangehensweise muss bei der Darstellung dieser Heptulosen die schwankende Ausbeute und die nicht vernachlässigbare Anzahl an Zwischenstufen berücksichtigt werden, welche durch Derivatisierungen in der Regel auch noch zunimmt. Im Falle von Manno- und Glucoheptulosen sowie deren Derivate ist jedoch eine durchaus umfassende Forschung betrieben worden, mit einer Vielzahl an Optimierungen.

1.5 Die chemoenzymatische Synthese und das Enzym Transketolase

Die Verwendung von Enzymen als Katalysatoren in der organischen Synthese wird als chemoenzymatische Synthese bezeichnet. Ihre Anwendung findet aufgrund ihrer Vorzüge immer häufiger statt. Die Vorteile können zahlreich sein, so reduziert der Einsatz von Enzymen die Anzahl synthetischer Stufen und die Notwendigkeit von Schutzgruppen. Zudem ist eine hohe Regio- und Stereoselektivität gewährleistet, was den Einsatz zusätzlicher stereokontrollierender Auxiliare redundant macht. Die meist milden Reaktionsbedingungen wie wässriges Milieu, pH ca. 7 und Raumtemperatur ermöglichen ebenfalls den Einsatz eines breiten Spektrums an Substraten, sowie die Kompatibilität verschiedener Enzyme. Im Allgemeinen existieren zwei Herangehensweisen in der chemoenzymatischen Methodik. Im einen Fall werden dem enzymatischen Syntheseschritt chemische Synthesestufen vorangestellt, im anderen Fall findet erst die enzymatische Synthese statt, sodass im Nachhinein chemische Derivatisierung durchgeführt werden kann.^[33-34]

Aus sechs der sieben Enzymklassen lassen sich Vertreter für die Anwendung chemoenzymatischer Reaktionen finden: Oxidoreduktasen (EC 1), Transferasen (EC 2), Hydrolasen (EC 3), Lyasen (EC 4), Isomerasen (EC 5) und Ligasen (EC 6).^[35] Die Transketolase gehört zur Gruppe der Transferasen und ihre Anwendung stellt einen wichtigen Teil dieser Arbeit dar. Wie aus ihrem Namen ableitbar, ist sie an der Übertragung von Ketogruppen beteiligt. *In vivo* katalysiert das Enzym im Pentosephosphatweg die Biosynthese von Sedoheptulose-7-phosphat (**44**) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**45**) durch den reversiblen Transfer einer C₂-Ketoleinheit von Xylulose-5-phosphat (**42**) auf Ribose-5-phosphat (**43**, Abb. 7A). Der Pentosephosphatweg ist ein Stoffwechselweg zur Bildung von Reduktionsäquivalenten (NADPH), durch die Verwertung von Kohlenhydraten. Die verarbeiteten Kohlenhydrate werden anschließend für die Nukleotid-Biosynthese, sowie im Shikimatweg zur Biosynthese von aromatischen Aminosäuren verwendet.^[36-37] Wie anhand des *in vivo* Beispiels erkennbar, bevorzugt das Enzym α -Hydroxyaldehyde mit einer (*R*)-Konfiguration an C-2. Zudem weist das neu entstandene chirale Zentrum eine (*S*)-Konfiguration auf. Somit ergibt sich immer eine (3*S*, 4*R*)-Ketose als Hauptprodukt.^[37-38] Damit ist die Produktbildung sowohl stereospezifisch, aufgrund des neu entstandenen chiralen Zentrums, als auch in ihrer Umsetzung stereoselektiv, abgebildet durch die am α -Hydroxyaldehyden bevorzugte Konfiguration an C-2. Durch den Einsatz von β -Hydroxypyruvat (HPA, **46**) als C₂-Donor, kann die Reversibilität der Transketolase-

Reaktion unterbunden werden, da neben dem eigentlichen Produkt lediglich CO_2 entsteht, welches als Gas aus der Reaktionslösung entweicht und somit das Reaktionsgleichgewicht zu Gunsten des Produktes verschiebt (Abb. 7B).^[39-40] Typischerweise wird Hydroxypyruvat als Salz mit den möglichen Gegenionen Lithium, Natrium oder Kalium eingesetzt.^[41-42] Thiaminpyrophosphat (TPP, **47**) dient hierbei als Coenzym. Zusätzlich wird ein divalentes Metallion, zumeist Ca^{2+} aber auch Mg^{2+} oder Mn^{2+} , benötigt (Abb. 8).^[43]

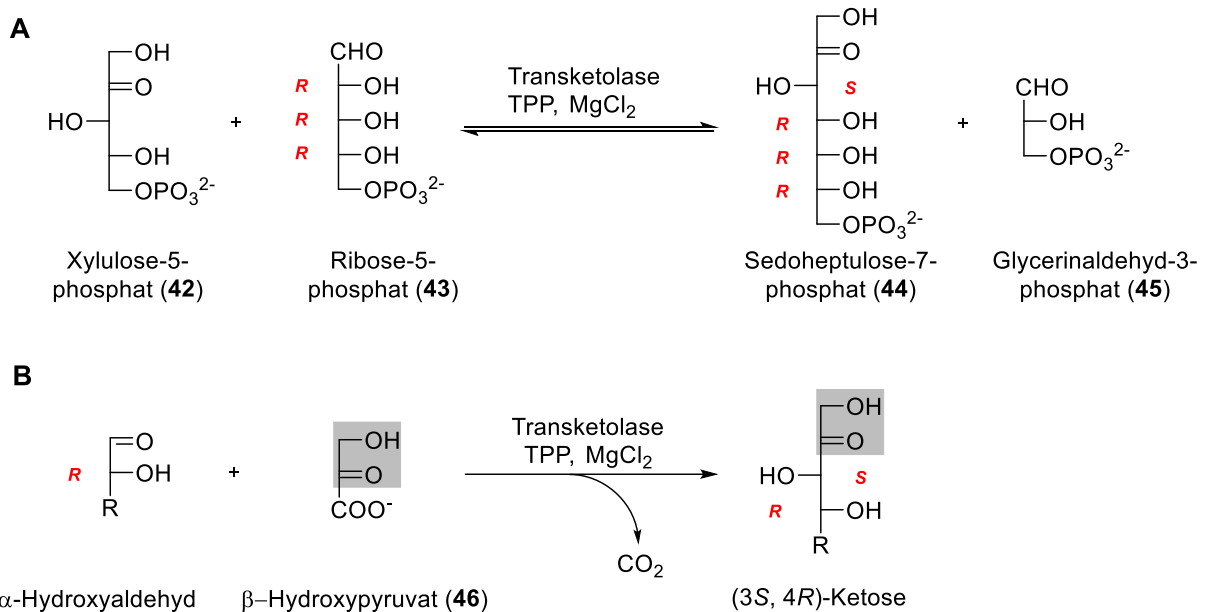


Abbildung 7: A) Katalysierte *in vivo* Reaktion des Enzyms Transketolase als Teil des Pentosephosphatweges. B) Allgemeine Transketolase-Reaktion eines α -Hydroxyaldehyden mit β -Hydroxy pyruvat (**46**) zur Darstellung von (3S, 4R)-Ketosen.

Der Mechanismus der Transketolase-Reaktion (Abb. 8) ist entscheidend vom Coenzym TPP (**47**), sowie vom divalenten Kation abhängig. Hierbei dient das Kation der Bildung des aktiven Zentrums durch Verbrückung der Pyrophosphatgruppe des TPPs mit dem Apoprotein.^[44] Durch eine Deprotonierung des Coenzym wird die aktivierte TPP-Ylid Spezies gebildet. Nucleophiler Angriff des Ylids an der Ketogruppe des C_2 -Donors führt im ersten Schritt zur TPP-Donor-Bindung. Im zweiten Schritt wird der später nicht übertragene Donor-Rest abgespalten. Im Falle von HPA (**46**) ist dies CO_2 . Ein nucleophiler Angriff der ehemaligen Ketogruppe des Donors am Aldehyd des Akzeptors ergibt im dritten Schritt die TPP-Donor-Akzeptor-Bindung. Im letzten Schritt wird durch Deprotonierung der Hydroxylgruppe an C-2 die Ketogruppe des Produktes generiert, welches gleichzeitig vom katalytisch aktiven Zentrum abgespalten wird. Das TPP-Ylid wird hierbei erneut generiert und steht für den nächsten Katalysezyklus zur Verfügung.^[45-47]

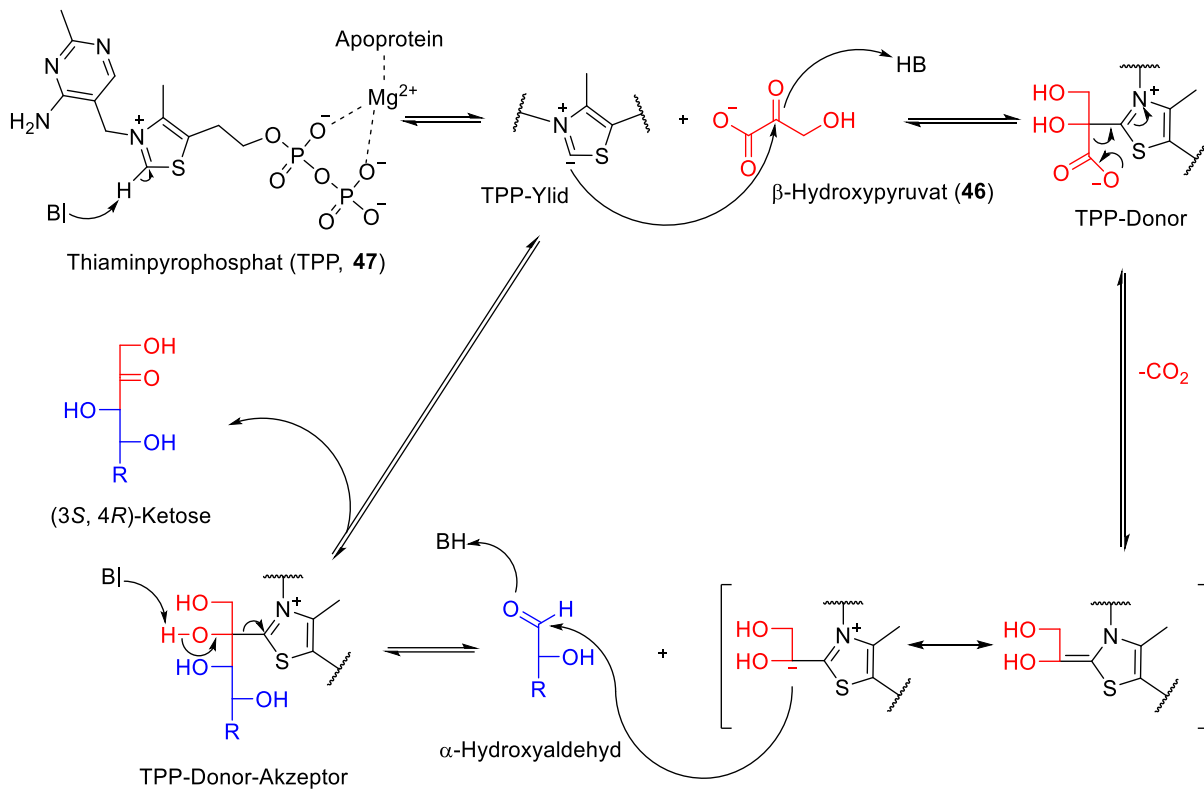


Abbildung 8: Mechanismus der Transketolase zur Darstellung einer (3*S*, 4*R*)-Ketose, ausgehend von einem α-Hydroxyaldehyd (blau) und β-Hydroxypyruvat (46). Ein divalentes Kation (Mg²⁺) sorgt hierbei für die Verbrückung des Coenzym TPP (47) mit dem Apoprotein.

Anwendungsbeispiele für den Einsatz der Transketolase in der Organischen Chemie sind zahlreich, so wurde beispielsweise 6-Desoxy-L-sorbose (49), unter Einsatz von aus Spinat isolierter Transketolase, synthetisiert. Edukte waren hierbei β-Hydroxypyruvat (46) und 4-Desoxy-L-threose (48, Abb. 9). 6-Desoxy-L-sorbose (49) ist ein wichtiger Vorläufer des Aromastoffes Furaneol (50), welcher aufgrund seines karamellartigen Geschmacks in der Lebensmittelindustrie verwendet wird. Des Weiteren wird an Multienzym-*One-Pot*-Reaktionen geforscht, in denen beispielsweise die Substrate der Transketolase *in situ* durch andere Enzyme hergestellt werden.^[36, 38]

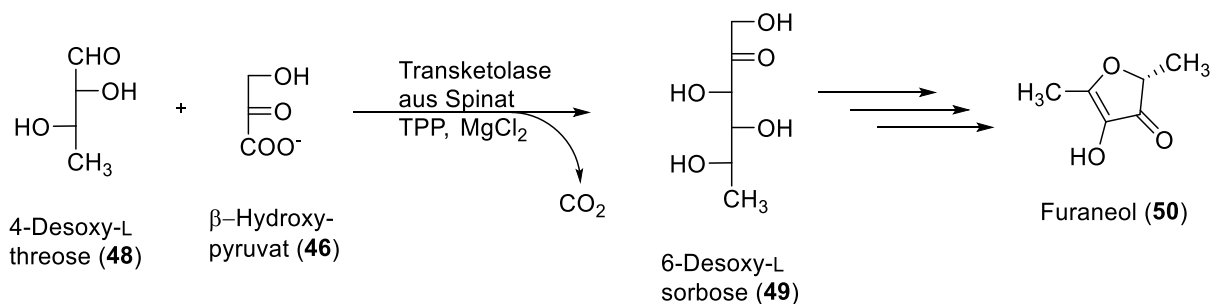


Abbildung 9: Anwendungsbeispiel für den Einsatz des Enzyms Transketolase in der Organischen Chemie.

1.6 Prodrugs und Propesticides

Prodrugs sind definitionsgemäß bioreversible Derivate pharmazeutisch genutzter Verbindungen, welche *in vivo* eine enzymatische, chemische oder physikalische Transformation durchlaufen, was zur gezielten Freisetzung der aktiven Verbindung mit gewünschtem pharmakologischem Profil führt.^[48] Neben dem allgemeinen Begriff der *Prodrugs*, welcher üblicherweise im humanpharmakologischen Kontext genutzt wird, gibt es den Begriff der *Propesticides*, welche Schädlingsbekämpfungen umfassen. *Propesticides* können hierbei weiter in die drei Unterkategorien *Proherbicides*, *Proinsecticides* und *Profungicides* unterteilt werden.^[49] Gründe für die Verwendung von „*Pro*“-Verbindungen können vielfältig sein. Die häufigsten sind: Löslichkeit in wässrigem Milieu, chemische Instabilität, Absorption, Verteilung, Metabolisierung, Ausscheidung, Toxizität, Bioverfügbarkeit und gezielte Selektivität. Häufigster Grund ist jedoch das Überwinden einer biologischen Barriere, wie beispielsweise der Blut-Hirn-Schranke, der bakteriellen Zellwand oder der Blattoberfläche (Abb. 10A).^[50] Die bioreversiblen Derivatisierungsmöglichkeiten sind hierbei abhängig von den jeweiligen funktionellen Gruppen am Wirkstoffmolekül und dem biologischen System. Funktionelle Gruppen, welche im Rahmen dieser Arbeit vorkommen, sind unter anderem Carbonylgruppen, welche zu Oximen und Iminen derivatisiert werden können, sowie Hydroxylgruppen, zu Ethern, Estern und Phosphatestern. Außerdem ließen sich Carbonsäuren beispielsweise zu Estern und Amiden derivatisieren und Phosphonate zu Phosphonatestern modifizieren (Abb. 10B).^[48]

Das *Prodrug* Pivampicillin (**51**) wird beispielsweise als Breitbandantibiotikum eingesetzt. Es handelt sich hierbei um den Pivaloyloxymethylester des β -Lactam-Antibiotikums Ampicillin (**52**, Abb. 11). Die Einführung des *Pro*-Teils führt zur Erhöhung der Lipophilie durch Maskierung der Carboxylgruppe und somit zur Verbesserung der passiven Membranpermeabilität. Dies erhöht die orale Bioverfügbarkeit von ursprünglich 32-55 % auf 87-94 %. Die Aktivierung und somit Freisetzung von Ampicillin (**52**) findet durch Esterasen statt.^[48]

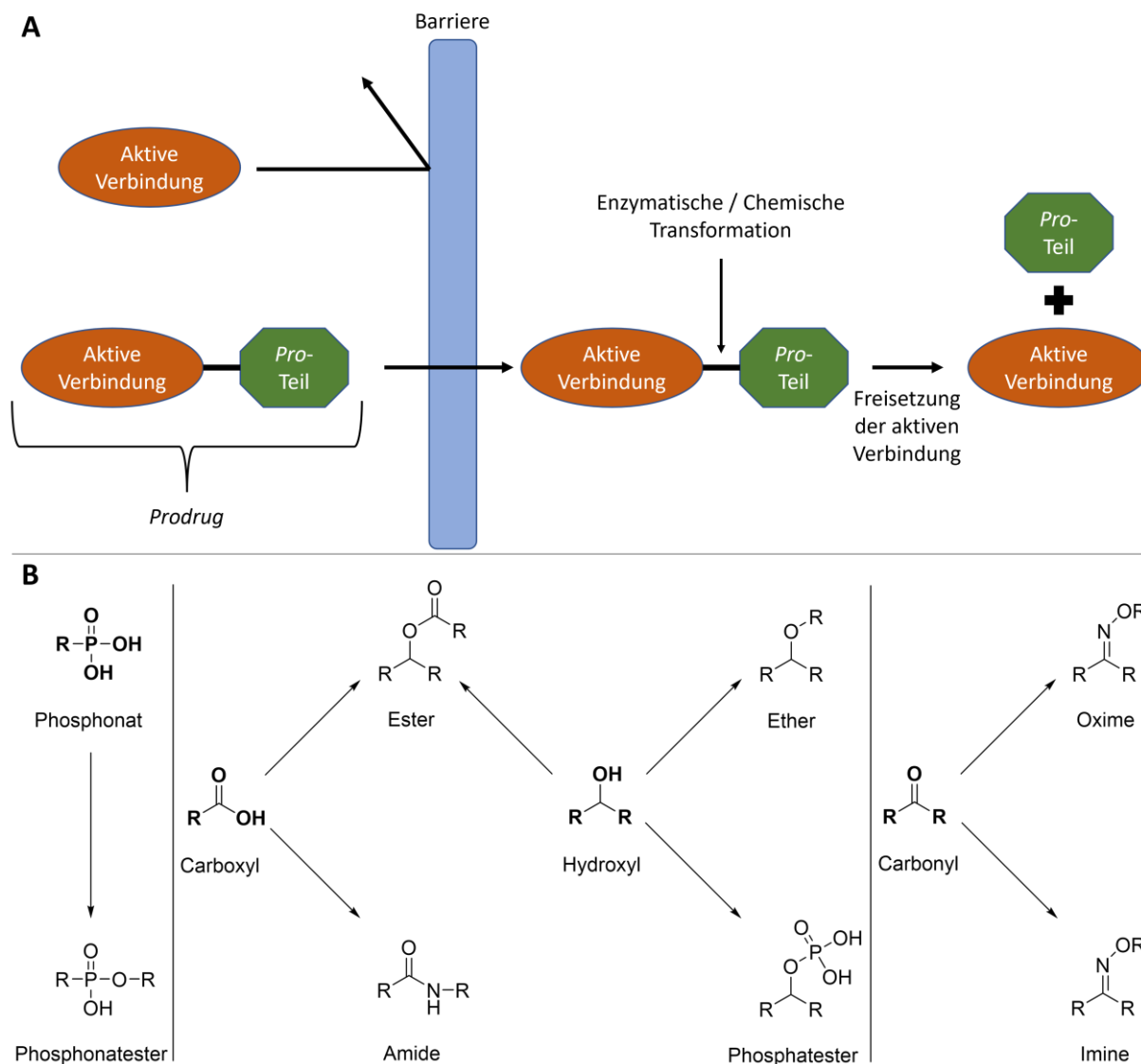


Abbildung 10: A) Funktionsweise eines *Prodrug*-Ansatzes. Modifiziert von RAUTIO *et al.*^[48] B) Mögliche Derivatisierungen funktioneller Gruppen zur Darstellung von *Prodrugs*.

Ein weiteres Beispiel ist das Herbizid DCPMU (1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-methylharnstoff, **55**) welches die Photosynthese am Photosystem II inhibiert. Für dieses Herbizid existieren verschiedene *Proherbicides*, so unter anderem Diuron (**53**) und Linuron (**54**), welche durch enzymatische *N*-Demethylierung und *N*-Demethoxylierung zum aktiven Metaboliten DCPMU (**55**) werden (Abb. 11).^[51-52]

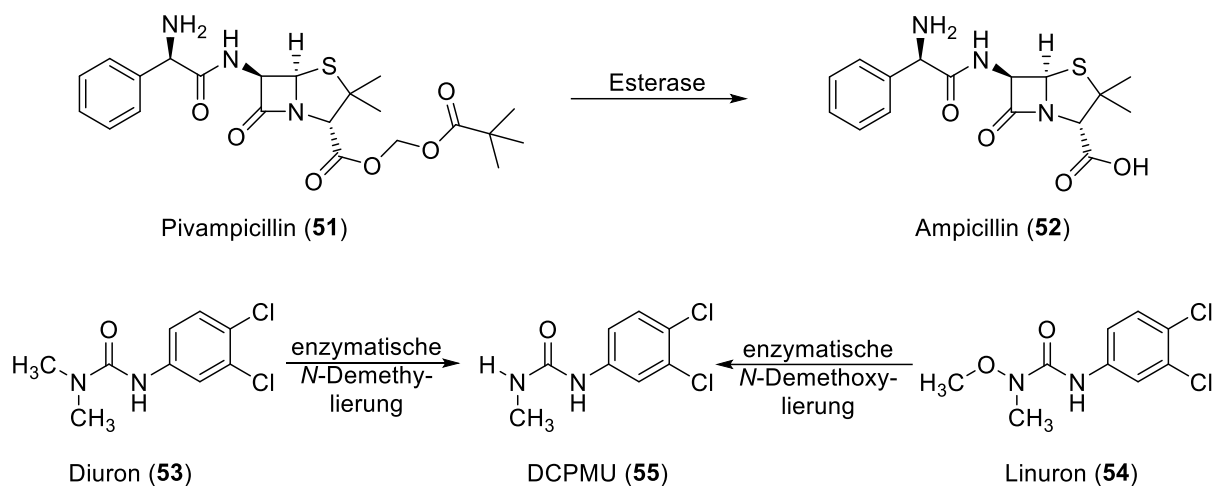


Abbildung 11: *Prodrug*-Beispiel Pivampicillin (51), welches durch Esterasen zur aktiven Verbindung Ampicillin (52) umgesetzt wird. Sowie die *Proherbicide*-Beispiele Diuron (53) und Linuron (54) welche ebenfalls durch enzymatische Umsetzung zum Herbizid DCPMU (55) reagieren.

1.7 Molecular Docking und das Docking Programm FITTED

Molecular Docking ist ein *in silico* Verfahren, bei dem die molekularen Wechselwirkungen zwischen zwei Biomolekülen computerbasiert untersucht werden. Hierbei nimmt ein Biomolekül den Part des Liganden ein (zumeist eine niedermolekulare Verbindung) und ein weiteres den Part des Akzeptors (meist ein Protein).^[53] Weitere Kombinationsmöglichkeiten sind Protein-Protein oder Protein-Nukleinsäure-Komplexe.^[54]

Ein schon in Kapitel 1.3 genanntes Beispiel ist die *Docking*-Studie der Verbindung IMB-T130 (18) an dem Enzym DHQS. Hierbei nimmt das Molekül den Part des Liganden ein und das Enzym den Part des Akzeptors. Durch diese *Docking*-Studie sollten die Interaktionsstellen zwischen den beiden Biomolekülen lokalisiert werden, wobei fünf Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms bestimmt werden konnten, welche sowohl hauptverantwortlich für die Wechselwirkungen sind, als auch für die Funktionsweise des Enzyms. Dies bestätigte die inhibierende Wirkung der Verbindung auf das Enzym.^[24]

Molecular Docking kann allgemein in die zwei Abschnitte „*Sampling* Algorithmus“ und „*Scoring* Funktion“ unterteilt werden. Im ersten Schritt werden Position, Orientierung und Konformation des Liganden innerhalb der Bindungstasche anhand eines Algorithmus variiert, um mögliche Ligand-Akzeptor-Komplexe zu generieren. Aufgrund der Vielzahl möglicher Komplexe durch die genannten Variablen ist die Nutzung eines Algorithmus unabdingbar. Im nächsten Schritt findet ein Ranking der über den vorherigen Algorithmus, generierten Ligand-

Akzeptor-Komplexe anhand einer mathematischen *Scoring* Funktion statt. Der hierbei erhaltene Score-Wert ist beispielsweise abhängig von der Stabilität des Komplexes, also der freien Energie des Systems, welche so niedrig wie möglich sein sollte. Zur Berechnung dieser Energie werden unter anderem nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen berücksichtigt. Wie schon beim *Sampling* Algorithmus, existieren auch beim *Scoring* verschiedene Funktionen, die auf unterschiedlichen mathematischen Grundlagen wie beispielsweise der Kraftfeld-Theorie basieren und somit unterschiedliche Vor- und Nachteile besitzen.^[55-56]

Die dreidimensionale Struktur des Proteins kann, falls vorhanden, von der PROTEIN DATA BANK (PDB) bezogen werden. Grundlage dieser Strukturen sind Kristallstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie.^[57] Häufige Anwendungsgebiete für *Molecular Docking* sind die Arzneimittelforschung und die Lebensmittelindustrie.^[56]

Allgemein existieren zwei Methoden des *Dockings*. Im *Rigid Docking* sind sowohl Ligand als auch Akzeptor starre Strukturen. Dem steht das *Flexible Docking* gegenüber, in welchem beide Komplexpartner ihre Konformation ändern dürfen, was einen vielfach höheren Rechenaufwand mit sich bringt.^[53, 58] Aus diesen beiden Methoden hat sich in den letzten Jahren ein Hybridansatz entwickelt, bei welchem der Akzeptor starr, und der Ligand flexibel ist. Dieser Hybridansatz wird als *Semi-flexible Docking* bezeichnet und wird heutzutage von den meisten Docking-Programmen angewendet, da der Rechenaufwand moderat ist und gleichzeitig der Mehrgewinn des flexiblen Liganden nachweislich bessere Ergebnisse liefert.^[56, 59]

Über die letzten zwei Jahrzehnte hat die Zahl der Publikationen mit dem Stichwort „*docking*“ beträchtlich zugenommen, was auch zu einem Anstieg der Zahl an *Docking*-Programmen führte.^[58] Hierbei nutzt jedes Programm andere Algorithmen, Parameter und Gewichtungen, um die Akzeptor-Ligand-Wechselwirkungen zu berechnen. Die bekanntesten *Docking*-Programme sind unter anderem AUTODOCK, GOLD, FLEXX, SWISSDOCK und FITTED. Das Programm FITTED, welches im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, ist hierbei Teil der FORECASTER Plattform, entwickelt von der Firma MOLECULAR FORECASTER unter Leitung von NICOLAS MOITESSIER, Professor an der MCGILL *University* in Montreal, Kanada.

Der *Sampling* Algorithmus des *Docking* Programms FITTED basiert auf dem sogenannten „*Genetic algorithm*“ Modell, welches ganz allgemein zur Gruppe der stochastischen

Methoden zählt. Hierbei werden die verschiedenen Freiheitsgrade des Liganden in sogenannte Gene codiert. Die Gesamtheit aller Freiheitsgrade eines Komplexes wird wiederum als Chromosom definiert. Durch genetische Operatoren können verschiedene Komplexe generiert werden. Die Standardoperatoren für den *Genetic Algorithm* sind der Mutations- und Kreuzungsoperator. Der Mutationsoperator sorgt hierbei für zufällige Genänderungen, der Kreuzungsoperator tauscht hingegen Gene zwischen zwei Chromosomen zufällig aus. Diese genetischen Operatoren sind den biologischen Analoga Rekombination und Mutation angelehnt. Im Falle des FORECASTERS wurden weitere Operatoren hinzugefügt, um die Geschwindigkeit der Berechnungen zu erhöhen. Diese umfassen beispielsweise einen Lernoperator, welcher für eine stufenweise Energieminimierung verantwortlich ist und einen Selektionsoperator, welcher frühzeitig Komplexe auf Eignung untersucht.^[59-61]

Die *Scoring* Funktion von FITTED basiert auf der Kraftfeld-Theorie, sowie zwei zusätzlichen Termen für Wasserstoffbrückenbindungen und Entropieänderungen beim Eingehen der Ligand-Akzeptor-Bindung.^[62] Der Kraftfeld-Anteil der *Scoring* Funktion setzt sich aus der Summe zweier Terme zusammen, der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungsenergie (intermolekular) und der internen Liganden-Energie (intramolekular).^[56, 63] Der intermolekulare Term berücksichtigt hierbei beispielsweise die van der Waals Kräfte, sowie das elektrostatische Potential.^[60]

Docking-Ablauf des Programms FITTED:

Das FITTED-Programm zielt darauf ab, eine allumfassende Dockingsoftware mit allen nötigen Tools zu bieten, was die zusätzliche Nutzung anderer Software minimieren soll. Abbildung 12 zeigt die Benutzeroberfläche mit allen enthaltenen Tools, auf welche im Nachfolgenden eingegangen wird.

Die Benutzeroberfläche ist in zwei Informationsstränge untergliedert. Der linke Prozesspfad widmet sich ausschließlich dem Liganden, der rechte dem Protein. Der Ligandenpfad beginnt mit der Erstellung eines dreidimensionalen Liganden, ausgehend von einer 2D-Struktur. Die 2D-Struktur kann entweder über das implementierte „*Sketcher2D*“-Modul erstellt werden oder über die Software CHEMDRAW. Hierbei muss die 2D-Struktur im SDF-Format abgespeichert werden. Über das Tool CONVERT (*Conformational Optimization of Necessary Virtual Enantiomers, Rotamers and Tautomers*) wird die 2D-SDF-Datei anschließend in eine

3D-mol2-Datei konvertiert. Wichtige Schlüsselindikatoren und -schritte für die 3D-Modellierung sind hierbei beispielsweise der Hybridisierungsstatus eines jeden Atoms, die Abschätzung der pKs-Werte der Stickstoffatome auf Basis der Hybridisierung und Aromatizität, das Einfügen von Wasserstoffatomen, die Optimierung von Bindungslänge, Winkel und Torsionswinkel unter Berücksichtigung von Geometrie und Kraftfeldparametern, das Durchführen einer graduellen Energieminimierung unter der Verwendung molekularer Mechanismen sowie die Zusammenstellung aller Tautomere/Isomere als mol2-Datei.^[64]

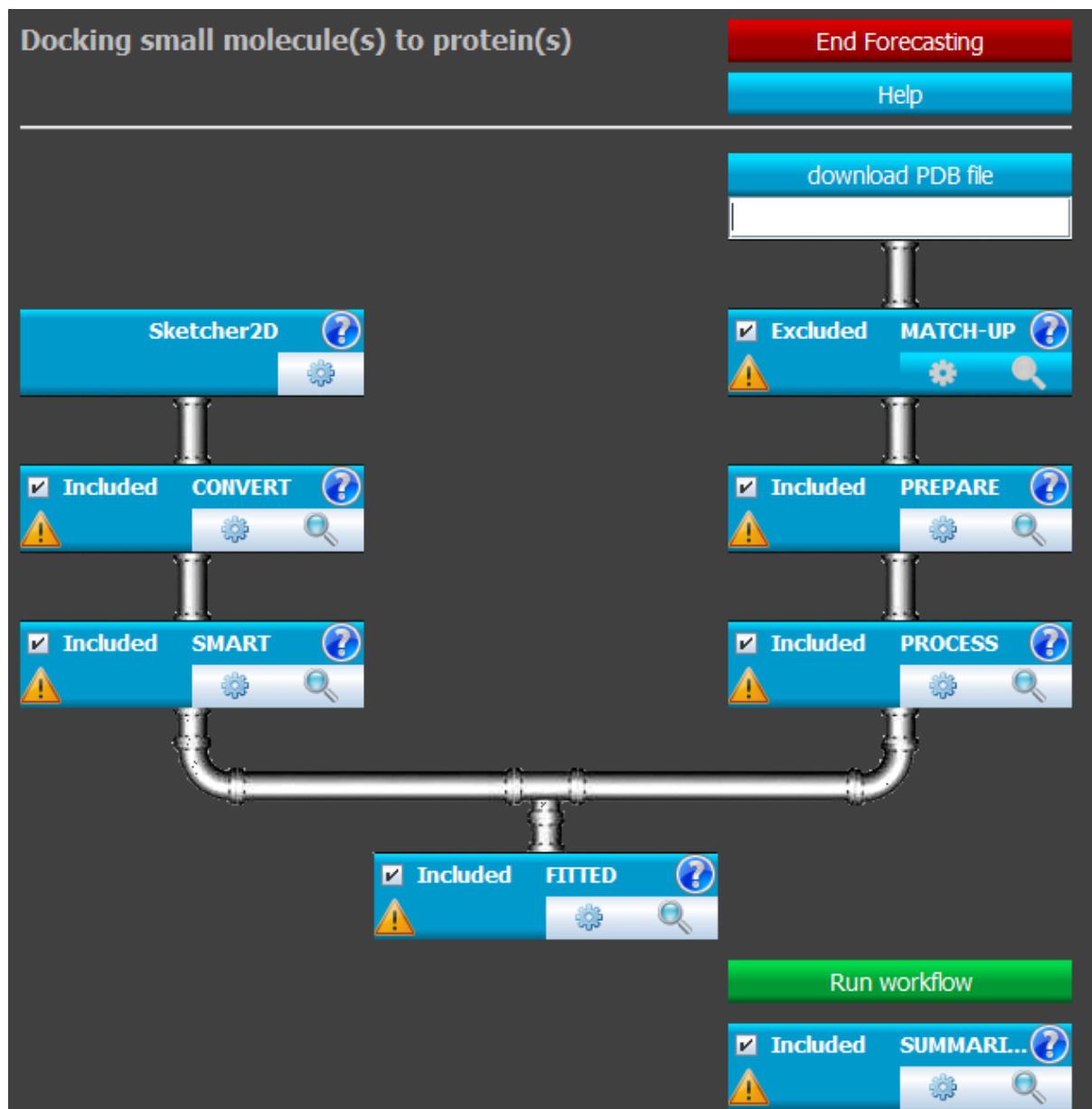


Abbildung 12: Benutzeroberfläche der Docking-Software FITTED. Jeder Abschnitt muss entsprechend des Schemas von oben nach unten bearbeitet werden.

Das nachfolgende Tool SMART (*Small Molecule Atom typing and Rotatable Torsion assignment*) vereinheitlicht anschließend die 3D-Modelle und bereitet sie für das anschließende *Docking* vor. Hierbei generiert es eine Z-Matrix, um die Struktur einheitlich darzustellen. Des Weiteren identifiziert es alle Ringe, bestimmt Bindungsordnung und Hybridisierung, erkennt aromatische Strukturen sowie funktionelle Gruppen und generiert hieraus schließlich eine *Docking*-fähige mol2-Datei.^[62]

Die rechte Seite befasst sich wiederum ausschließlich mit dem Protein, in welches der Ligand gedockt werden soll. Über den Reiter „*download PDB file*“ kann direkt der vierstellige PDB-Code für das jeweilige Protein eingetragen und heruntergeladen werden. Ein manueller Download ist somit nicht nötig. Wichtige Einschränkung bei der Auswahl des korrekten PDB-Files ist, dass die Proteinstruktur zwingend einen Liganden (Substrat oder Inhibitor) im aktiven Zentrum aufweisen muss, da hiermit die Position des aktiven Zentrums definiert wird.

Um anstatt eines *Semi-flexible Dockings* ein *Flexible Docking* durchzuführen, kann das Tool MATCH-UP verwendet werden. Es überlagert mehrere PDB-Files desselben Proteins und simuliert somit die Proteinflexibilität. Ein *Flexible Docking* ist nur möglich, wenn mehrere PDB-Files desselben Proteins, beispielsweise aus verschiedenen Spezies, existieren. Die Generierung der Superposition setzt hierbei ihren Fokus auf die Überlagerung am aktiven Zentrum. Durch Deletion und Mutation werden die Primärstrukturen der einzelnen Proteine angeglichen, sodass lediglich die Koordinaten, nicht aber die Primärstrukturen sich unterscheiden. Deletion und Mutation sollten hierbei nicht im aktiven Zentrum stattfinden.^[65]

Das nächste Tool PREPARE (*Protein Rotamer Elaboration and Protonation based on Accurate Residue Energy*) generiert entsprechend zu CONVERT für das Protein die mol2-Dateien ausgehend von den eingespeisten PDB-Dateien. Hierbei separiert das Tool das Protein vom Liganden, welcher im aktiven Zentrum sitzt. Zudem rekonstruiert PREPARE fehlende Seitenketten, fügt Wasserstoffatome, sowie Wassermoleküle zum Protein, identifiziert mögliche Konformationen, sowie Protonierungsgrade und generiert schlussendlich die optimierte mol2-Datei für das Protein bzw. Enzym der Wahl.^[64]

Das Tool PROCESS (*PROtein Conformational Ensemble System Setup*) bereitet entsprechend SMART das Protein für das *Docking* vor. Hierbei definiert und identifiziert das Tool Hohlräume, sowie Interaktionsbereiche zwischen Protein und Ligand.^[64]

Nach Generierung der mol2-Dateien für Protein und Ligand kann mittels des Tools FITTED, unter Berücksichtigung des vorher beschriebenen *Sampling* Algorithmus und der *Scoring* Funktion, das *Docking* durchgeführt werden. Nach erfolgreichem *Docking* wird ein „*Summary file*“ erstellt, welches den Molekülnamen, den *Score*-Wert und die Energie beinhaltet. Zudem wird eine mol2-Datei des Liganden erstellt, welche passend zum besten *Score*-Wert die passende Position und Konformation besitzt.^[64-65]

1.8 Aufgabenstellung

Syntheseoptimierung und vollständige NMR-Charakterisierung von 7dSh (56)

Der Desoxyzucker 7-Desoxy-sedoheptulose (7dSh, **56**) wurde 2019 von KLAUS BRILISAUER (Arbeitsgruppen Prof. GROND und Prof. FORCHHAMMER) aus dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt. Zudem konnte die inhibitorische Eigenschaft der Verbindung gegenüber Cyanobakterien, sowie ihre herbizide Wirkung gegenüber Pflanzen festgestellt werden. BRILISAUER etablierte, aufgrund der geringen biosynthetischen Produktionsmenge und aufwendigen Aufreinigung der Verbindung aus der Kultur, eine chemoenzymatische Synthese zur Herstellung von 7dSh (**56**).^[66] Basierend hierauf sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Optimierung der Ausbeute der Transketolase-basierten chemoenzymatischen Reaktion durchgeführt werden. Des Weiteren sollte aufgrund der hohen Edukt-Kosten eine kosteneffizientere chemische Synthese der beiden Edukte 5-Desoxy-D-ribose (**58**) und β -Hydroxypyruvat (**46**) untersucht werden, sowie ein mögliches Upscaling der Produktion im Labor etabliert werden. Da zu diesem Zeitpunkt lediglich ¹H-NMR-Spektren vorlagen und zudem einzig das Hauptisomer charakterisiert wurde, war die vollständige NMR-Charakterisierung aller Isomere von großer Bedeutung.

Chemische Derivatisierung und Analyse der biologischen Aktivität von 7-Desoxy-sedoheptulose-Analoga zur Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Die ersten Untersuchungen des molekularen Wirkortes durch BRILISAUER wiesen aufgrund der Akkumulation des Metaboliten 3-Desoxyarabinoheptulose-7-phosphat (DAHP, **3**) auf das Enzym 3-Dehydrochinat-Synthase (DHQS) im Shikimat-Stoffwechselweg.^[66] Auf Basis dieses Wissens sollte eine Struktur-Wirkungs-Beziehung (Structure-activity relationship, SAR) aufgestellt werden. Damit einhergehend sollte eine Synthesestrategie etabliert werden, um effizient an mögliche Derivate von 7dSh (**56**) zu gelangen und somit die SAR-Studie zu ermöglichen. Wichtiger Bestandteil der Synthesestrategie sollte die Transketolase-basierte chemoenzymatische Reaktion sein, um einen Hybrid-Ansatz aus chemischen und chemoenzymatischen Stufen zu etablieren. Das zum Einsatz kommende Enzym Transketolase wurde im Rahmen dieser Studie selbst aufgereinigt. Die SAR-Analyse sollte sowohl *in vitro*, wie auch *in vivo* Studien am Cyanobakterium *Anabaena variabilis* (*A. variabilis*), als auch an der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) enthalten. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob mittels einer zusätzlichen *Docking*-Studie die biologischen Daten verifiziert und damit untermauert werden können.

Im Rahmen dieser chemischen Derivatisierungen sollte, zur Aufklärung der Biosynthese von 7dSh (**56**), im Rahmen eines Kooperationsprojektes („Glykobiotechnologie“, s. Kapitel 6) mit JOHANNA RAPP (Arbeitsgruppe FORCHHAMMER), zudem ¹³C-markierte 5-Desoxy-D-ribose (**58***), sowie ¹³C-markiertes 7dSh (**56***) dargestellt werden.

2. 7-Desoxy-D-sedoheptulose (7dSh, 56) – erster einer neuen Wirkstoffklasse

2.1 Vorangegangene Arbeiten

Der Naturstoff 7-Desoxy-D-sedoheptulose (7dSh, 7-Desoxy-D-althro-heptulose, **56**) ist ein C₇-Zucker in althro-Konfiguration mit einer fehlenden Hydroxylgruppe an C-7. Er wurde erstmals 1970 von EZAKI *et al.* aus der Forschungsgruppe NIIDA unter dem Namen SF-666 B beschrieben, wobei dieser die Verbindung aus einem neuen Bakterium der Spezies *Streptomyces setonensis* isoliert hatte. Die Forschungsgruppe konnte antibiotische Aktivität gegen das Bakterium *Gluconobacter suboxydans* nachweisen. Aufgrund der gering aufgelösten NMR-Spektren konnte das Verhältnis aus Pyranose- und Furanose-Form nicht bestimmt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine weitere Verbindung unter dem Namen SF-666 A publiziert. Es handelte sich hierbei um die Desoxy-heptose 7-Desoxy-D-glycero-D-glucoheptose (**57**). Die beiden Verbindungen unterscheiden sich lediglich durch die Position der Carbonylgruppe, weshalb SF-666 A (**57**) im Vergleich zu 7dSh (**56**) ein zusätzliches chirales Zentrum an C-2 besitzt. Für SF-666 A (**57**) konnte ebenfalls antibiotische Aktivität gegen das Bakterium *Gluconobacter suboxydans*, sowie einige *Staphylococcus aureus* Stämme nachgewiesen werden.^[67-69]

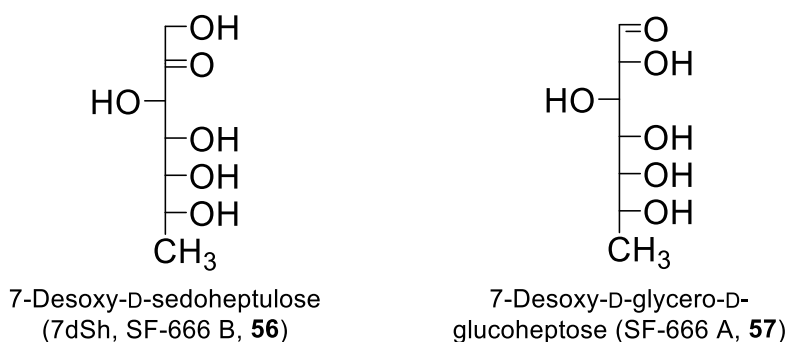


Abbildung 13: Struktureller Vergleich der beiden Verbindungen SF-666 A (**57**) und SF-666 B (**56**), 1970 von der Forschungsgruppe NIIDA publiziert.^[68]

7dSh aus Cyanobakterien

Knapp 40 Jahre später entdeckte BRILISAUER die Verbindung erneut, wobei er dessen bisher noch unbekanntes und zugleich wichtigsten, Eigenschaften aufdeckte. Er isolierte die Verbindung aus dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Hierbei handelt es sich um ein einzelliges Süßwasser-Cyanobakterium. Die Isolierung und Aufreinigung der Verbindung aus flüssiger Kultur erwies sich aufgrund niedriger Substanzmengen, hoher Polarität der Verbindung und fehlendem UV-Signal als nicht trivial, weshalb eine neue aktivitätsbasierte Aufreinigungsstrategie etabliert werden musste. Die erfolgreiche Aufreinigung des Naturstoffes aus dem Cyanobakterium beinhaltete schlussendlich fünf Schritte: Da aufgrund aktivitätsbasierter Untersuchungen bekannt war, dass die Verbindung nur im Kulturüberstand in größeren Mengen vorhanden ist, wurden durch Zentrifugation die cyanobakteriellen Zellen abgetrennt. Da sich die Verbindung nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahieren lässt, wurde der Kulturüberstand effizient lyophilisiert. Anschließende Größenausschluss-Chromatographie (Sephadex LH20) in Methanol sowie Normalphasen MPLC reduzierte die beträchtliche Salzlast und trennte einen Großteil der Verunreinigungen ab. Eine etablierte präparative HPLC mit RP-C₁₈-Säule war aufgrund der hohen Polarität der Verbindung nicht möglich. Der Einsatz der Spezialsäule Hi-Plex Ca führte erfolgreich zum Reinstoff. Die verwendete Säule ist eine Liganden- und Ionenaustauscher Säule welche im Temperaturbereich von 80-90 °C betrieben wird. Laufmittel ist im Normalfall Wasser, wobei bis zu 30 % Acetonitril oder 5 % Methanol verwendet werden können, was aber im Falle von 7dSh (**56**) nicht nötig war. Das Säulenmaterial ist aus einem quervernetzten sulfonierten Styrene-divinylbenzol-Gel mit Ca²⁺-Gegenionen aufgebaut. Zu Projektbeginn wurden Eluenten mittels eines Lichtstredetektors (ELSD) bestimmt. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte, aufgrund einer HPLC-Neubeschaffung, bei 194 nm UV-Absorption die Elution detektiert werden.^[66]

Strukturaufklärung

Zur anschließenden Strukturaufklärung der aufgereinigten Verbindung wurden verschiedene analytische Methoden herangezogen. Mittels hochauflösender Massenspektrometrie (ESI-HRMS) konnte auf die Summenformel C₇H₁₄O₆ geschlossen werden. Integrierte Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) konnte aufgrund der kleinen Molekülgröße lediglich aufzeigen, dass bis zu drei Wassermoleküle als Neutralverluste auftreten. ¹H-NMR-

Spektroskopie ließ darauf schließen, dass es sich um eine 7-Desoxy-heptulose handeln musste, welche hauptsächlich in der Furanose-Form vorliegt. Literaturrecherche zu bekannten 2-Heptulosen ließ auf eine altro-Form schließen, da diese die einzige literaturbekannte 2-Heptulose mit Furanose-Präferenz ist. Somit ergab sich die Verbindung 7-Desoxy-D-altro-heptulose (**56**) als plausibelste Strukturvorhersage. Da diese Verbindung schon von EZAKI *et al.* publiziert war, bezog BRILISAUER den ursprünglichen Produktionsstamm (*Streptomyces setonensis sp. nov.*) um die Verbindung hieraus zu isolieren und anschließend einen NMR- und Aktivitätsvergleich durchzuführen. Die NMR-Daten bestätigten die Struktur, jedoch konnte sowohl von der cyanobakteriellen, als auch von der aus dem Streptomyceten isolierten Verbindung, keine Aktivität gegen *Gluconobacter suboxydans* festgestellt werden. Jedoch konnte ein dosisabhängiger Effekt gegenüber dem Cyanobakterium *A. variabilis* ermittelt werden. Abhängig von der Konzentration hatte 7dSh (**56**) somit entweder einen bakteriostatischen oder einen bakteriziden Effekt.^[66]

Wirkmechanismus

Um den Wirkmechanismus aufzuklären, wurden mit 7dSh (**56**) behandelte *A. variabilis*-Zellen extrahiert und mittels LC-HRMS analysiert. Differentialspektren von behandelten und unbehandelten Zellen zeigten eine starke Akkumulation einer Verbindung mit der Summenformel $C_7H_{13}O_{10}P$. Der Abgleich des MS/MS-Fragmentierungsmusters mit der *in silico* Fragmentierungssoftware METFRAG sowie Literaturvergleich zeigten, dass es sich bei der akkumulierten Verbindung um 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat (DAHP, **3**) handeln könnte. Diese Verbindung ist das Substrat des Enzyms DHQS (vgl. Kapitel 1.2). Unter der Annahme, dass 7dSh (**56**) die DHQS als Teil des Shikimatweges inhibiert, müsste damit eine Störung des Aminosäuremetabolismus einhergehen. Da der Shikimatweg für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren unabdingbar ist, müsste eine Reduktion dieser in behandelten Zellen auftreten. Umgekehrt führt die Störung der Synthese aromatischer Aminosäuren zu einer Störung der Proteinbiosynthese und zum gesamten Aminosäurehaushalt, was zu einer Akkumulation Nicht-aromatischer Aminosäuren führen sollte. Analyse der Aminosäuremengen von behandelten und unbehandelten *A. variabilis*-Kulturen bestätigte die Vermutung. Der Gehalt der aromatischen Aminosäuren reduzierte sich deutlich in mit 7dSh (**56**) behandelten Kulturen (um 20 % bei Tyrosin, 30 % bei Phenylalanin und 55 % bei Tryptophan), wohingegen sich der Gehalt Nicht-aromatischer Aminosäuren

deutlich akkumulierte (dreifach im Falle von Isoleucin, Arginin und Valin; fünffach im Falle von Leucin).^[66]

Biologisches Profiling an Pilzen und Pflanzen

Neben der Untersuchung der biologischen Aktivität gegenüber Cyanobakterien wurden aufgrund des Wirkmechanismus weitere inhibitorische Untersuchungen an Lebewesen, die den Shikimatweg aufweisen, durchgeführt. Die Aktivität gegenüber Pilzen, am Beispiel des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*, zeigte lediglich in Minimalmedium eine Inhibierung des Wachstums, was sich in einer geringeren Wachstumsrate und einer geringeren optischen Dichte zeigte. Die herbizide Aktivität an der Modellpflanze *A. thaliana* erwies sich als überaus potent, was sich an der Größe der Jungpflanzen und an der morphologischen Erscheinung widerspiegelte. Selbst bei Konzentrationen im niedrigen micromolaren Bereich (25 μM) war ein signifikanter herbizider Effekt zu beobachten.^[66]

Toxikologie gegenüber humanen und tierischen Zellen

Erste zytotoxikologische Untersuchungen an verschiedenen Humanzellen (THP-1 Makrophagen, A549 Lungenepithelzellen, HepG2 Leber epithelartige Zellen, 293 embryonale Leberzellen und primäre Neutrophile) wurden ebenfalls durchgeführt, wobei 7dSh (**56**) in keinem der Tests einen negativen Einfluss, selbst bei sehr hohen Konzentrationen, zeigte.^[66]

Weitere zytotoxikologische Studien wurde von SCHWEIZER *et al.* durchgeführt, wobei es hier um die frühe Entwicklung von Zebrafischen ging. Hauptaugenmerk dieser Studie lag auf dem umstrittenen Glyphosat, welches ebenfalls ein Enzym im Shikimatweg hemmt. 7dSh (**56**) wurde hier ebenfalls als Shikimatinhibitor getestet. Die Verbindung hatte keinen Einfluss auf die Sterblichkeit. Zudem konnte keine Entwicklungsverzögerung oder Fehlbildung der Embryonen festgestellt werden. Lediglich eine geringfügig reduzierte Herzrate und beschleunigte Schlupfrate konnte bei einer überaus hohen Konzentration von 1 mM festgestellt werden.^[70]

2.2 Optimierung der chemoenzymatischen Synthese von 7dSh (56)

Aufgrund der geringen Produktion des Naturstoffes und der aufwendigen Aufreinigung aus dem Cyanobakterium, etablierte BRILISAUER die erste chemoenzymatische Synthese von 7dSh (56), ausgehend von kommerziell erhältlicher 5-Desoxy-D-ribose (58) und Lithium- β -hydroxypyruvat (Li-HPA, 46; Abb. 14). Die Synthese war hierbei an die Synthese von CHARMANTRAY *et al.* angelehnt, welcher Sedoheptulose-7-phosphat (44), ausgehend von Ribose-5-phosphat und Li-HPA (46) synthetisierte. Im Laufe der Reaktion findet eine Zunahme des pH-Wertes statt, welche im Falle von CHARMANTRAY mittels eines pH-Stat-Titrators ausgeglichen wurde, um so im Bereich des pH-Optimums der Transketolase zu bleiben.^[39] Da jedoch im Falle von BRILISAUER kein pH-Stat-Titrator zur Verfügung stand, wurde HEPES-Puffer für die Gewährleistung eines stabilen pH-Wertes verwendet. Die Reaktionszeit betrug 24 h und erbrachte eine Ausbeute von ca. 20 %.^[66]

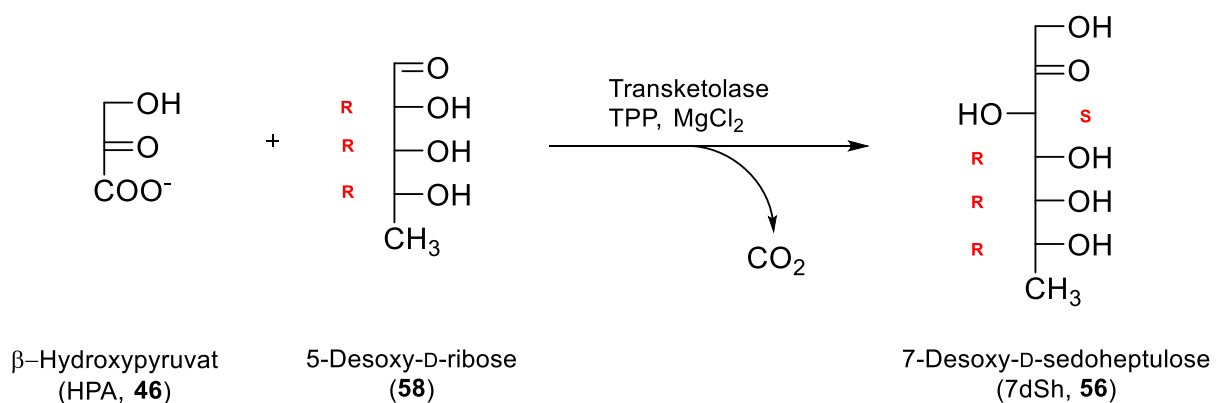


Abbildung 14: Chemoenzymatische Synthese von 7dSh (56) ausgehend von β -Hydroxypyruvat (HPA, 46) und 5-Desoxy-D-ribose (58)

Herstellung des Katalysators Transketolase

Ein Ziel dieser Arbeit war die Erhöhung der Ausbeute dieser chemoenzymatischen Reaktion. Vor der eigentlichen Optimierung der verschiedenen Parameter der Reaktion wurde die Transketolase erneut frisch exprimiert und aufgereinigt. Hierfür wurde ein transgener *E. coli*-Stamm genutzt, welcher durch Transformation einen Überexpressionsvektor mit der Transketolase von *Synechococcus elongatus* besaß. Dieser transgene Stamm wurde vorher im Arbeitskreis von Prof. FORCHHAMMER (Mikrobiologie/Organismische Interaktionen, Universität Tübingen) erzeugt. Da der Überexpressionsvektor einen Selektionsmarker mit einer Ampicillinresistenz besitzt, konnte durch Zugabe von Ampicillin (50 μ g/mL) in das Kulturmedium das Wachstum anderer Bakterien unterbunden werden. Die Überexpression

wurde durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert. IPTG bindet hierbei an den Repressor des Gens, wodurch dieser inaktiviert wird und die Überexpression der Transketolase beginnen kann. Zur Aufreinigung der überexprimierten Transketolase wurden die Zellen lysiert und das Enzym mittels Affinitätschromatographie aus dem Lysat isoliert. Möglich wurde diese Art der Proteinaufreinigung durch eine kurze, dem Gen der Transketolase direkt benachbarte Sequenz, die für ein Histidin-Oligopeptid codiert. Bei Expression der Transketolase wird der sogenannte „His-Tag“ der Primärstruktur des Enzyms angehängt. Der „Tag“ besteht aus sechs Histidin-Einheiten und besitzt eine hohe Affinität zu zweiwertigen Nickel- oder Cobalt-Ionen, welche fixiert auf einer Agarose-Säule in der Affinitätschromatographie zur Abtrennung von Proteinen mit „His-Tag“-Einheiten genutzt werden. Nach Abtrennung von Verunreinigungen durch Waschschriffe, kann durch Zugabe von Imidazol eine Verdrängung des „His-Tag“-Proteins erreicht werden, da Imidazol eine höhere Affinität zur „His-Tag“-Säule besitzt. Die folgende Dialyse in 50 % Glycerin machte das Protein bei -20 °C lagerbar.

Darstellung von β -Hydroxypyruvat

Um zusätzlich die Eduktkosten zu reduzieren, wurden 5-Desoxy-ribose (**58**) und Hydroxypyruvat (HPA, **46**) aus preiswerteren Startverbindungen chemisch selbst dargestellt. Die Synthese von 5-Desoxy-ribose (**58**) wird in Kapitel 3.1 umfassend beschrieben. HPA (**46**) wurde, angelehnt an die Literatur, ausgehend von 3-Brompyruvat (**59**) durch Zugabe der jeweiligen Base (LiOH, NaOH oder KOH) zum entsprechenden Salz synthetisiert (Li-HPA, Na-HPA oder K-HPA, **46**).^[41] Die NMR-spektroskopische Analyse deutete auf das Vorliegen zweier Spezies. Literaturrecherche ergab für Pyruvat denselben Sachverhalt, wobei es sich bei den beiden Spezies um die Oxofom und die Hydratform handelte.^[71] Vergleich der NMR-Daten unter Einbeziehung von 2D-Experimenten bestätigte das Vorliegen dieser beiden Spezies (Abb. 15).

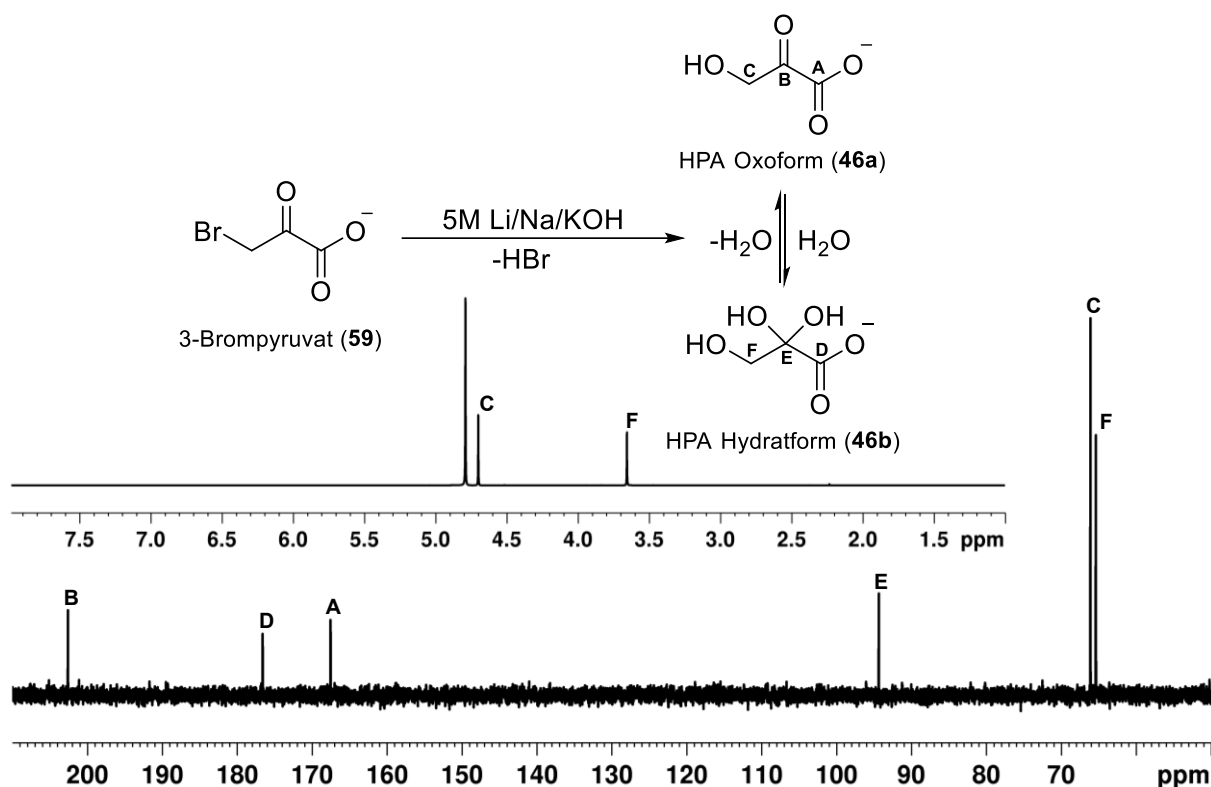


Abbildung 15: Reaktionsgleichung zur Darstellung von HPA (46a,b) ausgehend von 3-Bromopyruvat (59), sowie 1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopische Analyse des Reaktionsproduktes (D_2O , 400/100 MHz, 25 °C).

Synthese von 7dSh (56)

Mögliche Variablen, die prinzipiell Einfluss auf die Ausbeute der transketolase-basierten Synthese von 7dSh (56) haben können sind: Reaktionsdauer, Puffersystem, Pufferkonzentration, Substratmenge, Enzymmenge, Temperatur und die Herkunft des Enzyms. Bis auf die letzten beiden Parameter wurden alle Variablen untersucht (Abb. 17). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden alle Reaktionsumsätze als relative Ausbeuten in Prozent angegeben, wobei die Relation immer auf das Experiment mit der geringsten Ausbeute bezogen wurde. Die Ausbeute wurde ausgehend von der Menge an eingesetzter 5-Desoxy-ribose (58) berechnet. Im Folgenden wird auf jedes Experiment einzeln eingegangen. Da jedes aufgeführte Experiment nur ein Mal durchgeführt wurde, wird keine statistische Analyse vorgenommen. Aufgrund dessen dienen die hier erhaltenen Daten lediglich zu einem guten Überblick. Die Ausbeuten wurden mittels HPLC-UV bei einer Absorptionswellenlänge von 194 nm bestimmt. Über eine vorher angefertigte Kalibriergerade konnte so die Menge an hergestellter 7dSh (56) bestimmt werden. Die Reaktionsbedingungen waren, sofern nicht weiter definiert: Start pH: 7,0 - 7,5; Reaktionstemperatur: 30 °C; eingesetzte Menge an 5-Desoxy-ribose (58): 10 mg (75 μ mol); Transketolase-Menge: 10 μ L Kryostock-Lösung in

Glycerin (6,5 mg/mL); HPA (**46**) als Lithium-Salz; Abbildung 17 Experimente C-E: 10 mM Gly-Gly-Puffer.

KOBORI *et al.* untersuchten die Stabilität von HPA (**46**) in verschiedenen Puffersystemen und verschiedenen Pufferkonzentrationen. Hierbei stellte sich heraus, dass nach 24 h in 100 mM HEPES-Puffer nur noch ca. 15 % HPA (**46**) nachweisbar waren. In 25 mM HEPES-Puffer waren es hingegen noch ca. 94 %. Im Falle von Gly-Gly-Puffer waren es bei 100 mM noch ca. 73 % und bei 25 mM noch ca. 90 % HPA (**46**).^[72] Da die chemoenzymatische Synthese von BRILISAUER zur Darstellung von 7dSh (**56**) in 100 mM HEPES-Puffer durchgeführt wurde, war dieser Sachverhalt ein möglicher Ansatzpunkt zur Steigerung der Ausbeute.^[66] Anhand der publizierten Daten von KOBORI wurde in einer ersten Experimentreihe das Puffersystem, sowie die Pufferkonzentration variiert. Als Puffersysteme wurden Phosphat (**60**)-, HEPES (**61**)- sowie Gly-Gly-Puffer (**62**) verwendet (Abb. 16), zudem wurde die Reaktion in reinem Wasser durchgeführt (Ohne Puffer; Abb. 17A).

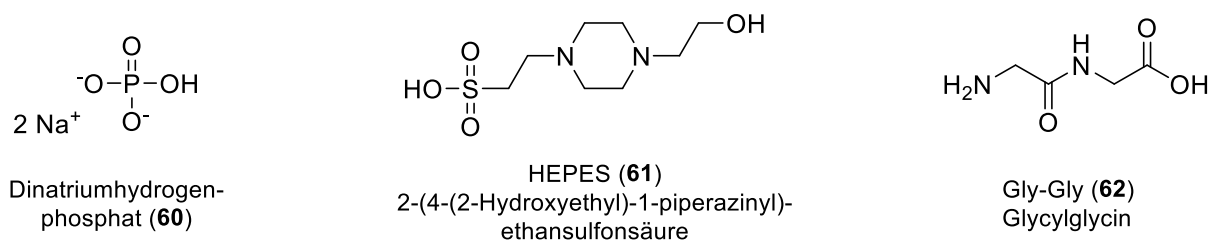


Abbildung 16: Strukturformeln der verwendeten Puffersysteme zur Steigerung der Ausbeute der transketolase-basierten Synthese von 7dSh (**56**). Als Phosphatpuffer wurde eine Mischung aus Na_2HPO_4 (**60**) und NaH_2PO_4 verwendet.

In Phosphatpuffer wurde die geringste Ausbeute ermittelt, gefolgt von HEPES-Puffer und dem pufferfreien System mit der ca. 1,6-fachen Ausbeute. Der Gly-Gly-Puffer erbrachte im Vergleich den größten Ausbeutegewinn. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde die Pufferkonzentration des Gly-Gly-Puffers variiert (Abb. 17B). Hierbei konnte jedoch lediglich ein Ausbeuteunterschied von ca. 5 % zwischen einer 10 mM und einer 100 mM Pufferkonzentration festgestellt werden. Eine Erhöhung der HPA-Äquivalente erbrachte ebenfalls nur eine geringe Zunahme der Ausbeute von maximal 20 % (Abb. 17D). Eine Verdopplung der Enzymmenge (Abb. 17C) führte hingegen zu einem deutlicheren Ausbeutegewinn von ca. 36 %, was darauf hindeuten, dass eine Anpassung der Reaktionsdauer ebenfalls zu einer Steigerung der Ausbeute führen könnte. Variation der Reaktionsdauer von 1-7 Tagen zeigte eine deutliche Zunahme der Ausbeute um bis zu 370 % (Abb. 17E). Lediglich der Messwert nach 6 Tagen muss als deutlicher Ausreißer gewertet werden. Der große Einfluss der Reaktionsdauer spricht für eine niedrige Umsatzrate, was sich

als plausibel darstellt, da Transketolasen allgemein eine höhere Affinität zu phosphorylierten Edukten besitzen. Sowohl BRILISAUER als auch SPRENGER bestätigten, dass phosphorylierte Edukte höhere Umsatzraten besitzen.^[66, 73]

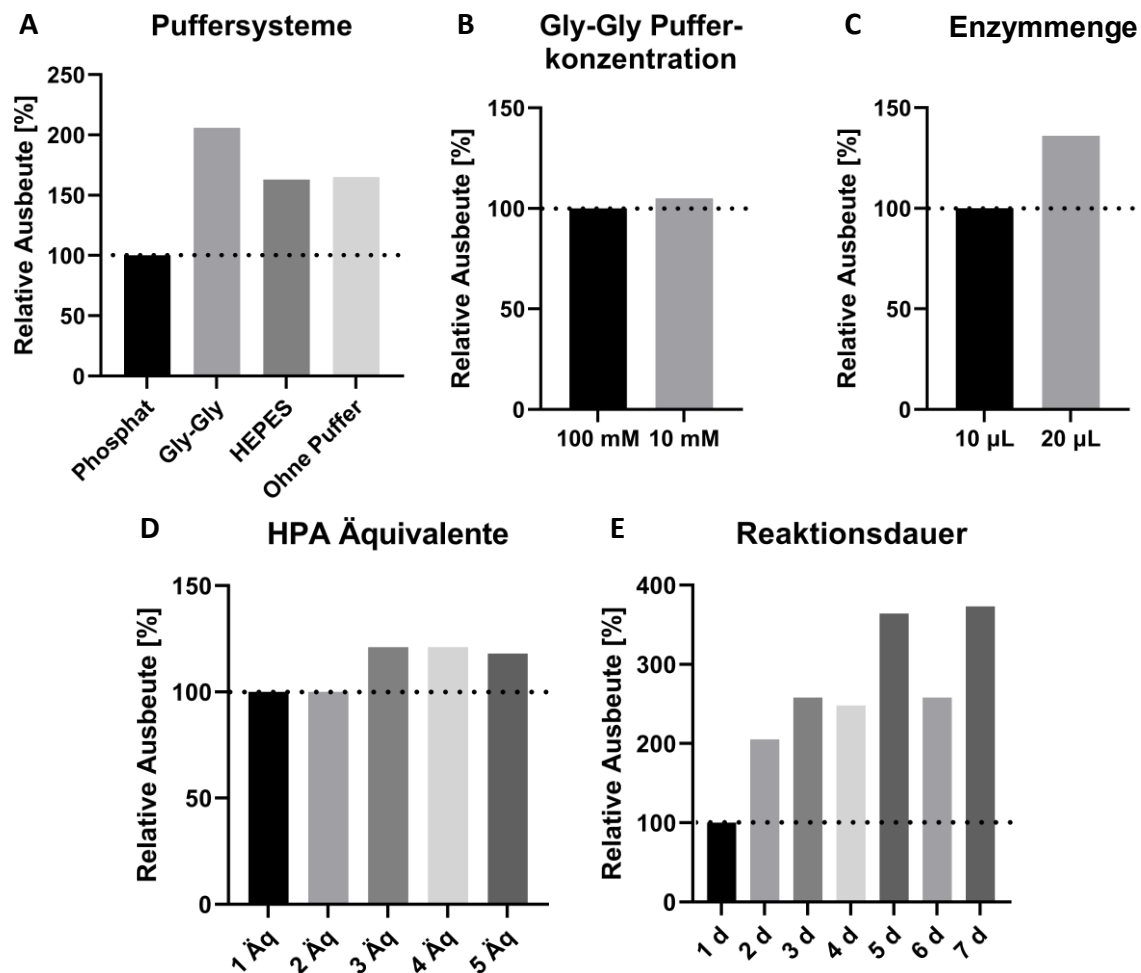


Abbildung 17: Optimierungen der chemoenzymatischen Synthese von 7dSh (**56**) anhand der Parameter: A) Puffersystem, B) Pufferkonzentration, C) Enzymmenge, D) HPA (**46**) Äquivalente und E) Reaktionsdauer. Ausbeute bestimmt mittels HPLC-UV, Absorptionswellenlänge 194 nm.

Anhand der hier erhaltenen Ergebnisse wurde folgendes Standardprotokoll etabliert: Die Reaktion wurde ohne Zusatz eines Puffers durchgeführt, da dies die anschließende präparative Aufreinigung von 7dSh (**56**) und dessen Analoga erleichterte. Um die fehlende Pufferwirkung auszugleichen, wurde täglich der pH-Wert neu eingestellt. Die geringe Umsatzrate, welche sowohl über die zugegebene Menge an Transketolase als auch die Reaktionsdauer beeinflusst werden konnte (vgl. Abb. 17C, E), wurde lediglich über die Reaktionszeit ausgeglichen, um die eingesetzte Menge an Transketolase gering zu halten. Hier wurde sich für eine siebentägige Reaktionsdauer entschieden (vgl. Abb. 17E). Die mögliche Zersetzung von HPA (**46**) in wässriger Lösung wurde durch tägliche Zugabe von 0,25-0,5 Äquivalenten

HPA (**46**) minimiert. Mittels dieses optimierten Standardprotokolls konnte die Ausbeute von ursprünglich ca. 20 % auf schlussendlich ca. 40 % verdoppelt werden.

2.3 Vollständige NMR-Charakterisierung und Strukturaufklärung von 7dSh (**56**)

Vorarbeiten: 7dSh (**56**) war in seiner Grundstruktur, vorliegend in der Furanose-Form, bekannt. Hierfür gab es ^1H -NMR-Spektren, sowie eine Zuordnung in Methanol- d_4 durch GROND. Weitere NMR-Charakterisierung war zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht vorgenommen worden.

Ziel war hierauf aufbauend eine vollständige NMR-Charakterisierung mit 1D- und 2D-Spektren, um sowohl die verschiedenen Formen als auch, falls möglich, die dazugehörigen Konformationen zu bestimmen. Die NMR-Spektren wurden hierfür in D_2O aufgenommen, da dies als Standard in der NMR-Analyse niedermolekulare Kohlenhydrate etabliert ist. Die NMR-Daten für D-Sedoheptulose (**23**, CEUSTERS *et al.*^[74]), sowie von D-Sedoheptulose-7-phosphat (**44**, CHARMANTRAY *et al.*^[39]) wurden für einen detaillierten Vergleich herangezogen. Mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ist das Vorliegen dreier Formen in D_2O zweifelsfrei belegbar. Speziell die ^{13}C -NMR-Bereiche 90-110 ppm für die anomeren C-Atome und 16-18 ppm für die C-7-Methylgruppen, sowie 1-1,5 ppm im ^1H -NMR-Spektrum für die Methylprotonen, bestätigen dies (Abb. 18). Eine mögliche vierte Komponente ist ebenfalls ersichtlich, wurde jedoch aufgrund der Vielzahl an Überlagerungen im ^1H -NMR-Spektrum, sowie aufgrund des geringen Anteils nicht eindeutig verifiziert. Das ^{13}C -NMR-Spektrum von CEUSTERS *et al.* zeigte ebenfalls einen möglichen vierten Signalsatz von D-Sedoheptulose (**23**), welcher jedoch ebenfalls nicht berücksichtigt wurde.^[74] Im Falle von CHARMANTRAY *et al.* war das Signal-Rausch-Verhältnis des Spektrums für D-Sedoheptulose-7-phosphat (**44**) zu gering, um diese mögliche weitere Komponente zu erkennen.^[39] Aufgrund der genannten Gründe wurden auch hier lediglich die drei Hauptkomponenten vollständig charakterisiert (Tab. 1).

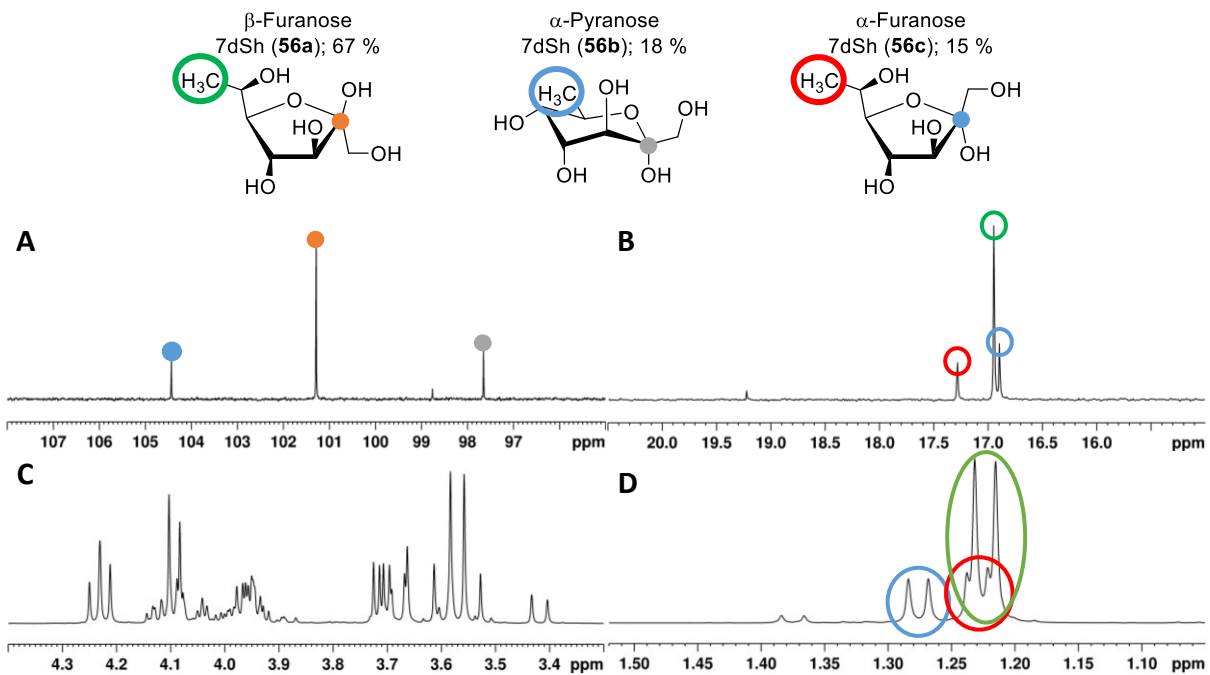
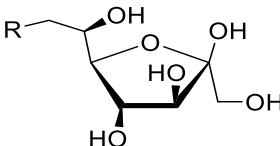
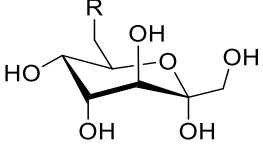
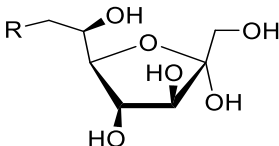


Abbildung 18: NMR-Analyse (D_2O , 400/100 MHz, 25 °C) der drei Isomeren von 7dSh (**56a-c**). Ausgewählte Signale sind farblich hervorgehoben. A) ^{13}C -NMR-Ausschnitt bildet Anomere Zentren ab. B) ^{13}C -NMR-Ausschnitt zeigt charakteristische Methylgruppen von 7dSh (**56a-c**). C) 1H -NMR-Ausschnitt ohne C-7-Methylprotonen; starke Überlagerung der Signale ersichtlich. D) 1H -NMR-Ausschnitt zeigt charakteristische C-7-Methylprotonen von 7dSh (**56a-c**).

Die Hauptkomponente konnte mittels COSY, HSQC und HMBC als Furanose bestimmt werden. NOESY-Kreuzkopplung zwischen 1-H und 3-H untermauerte, dass es sich hierbei um die β -Furanose-Form handelt. Die beiden Minderkomponenten lagen, wie schon im Falle von Sedoheptulose (**23**) und Sedoheptulose-7-phosphat (**44**), in der α -Furanose und α -Pyranose-Form vor. Ein 1H - 1H -TOCSY-Spektrum ermöglichte die Protonensignale eindeutig den jeweiligen Spinsystemen zuzuordnen. Das Verhältnis der drei Formen konnte mit 67 % β -Furanose, 18 % α -Pyranose und 15 % α -Furanose angegeben werden, ähnlich zu Sedoheptulose (**23**) und Sedoheptulose-7-phosphat (**44**, Tab. 1).^[39, 74]

Tabelle 1: A) ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten (D_2O , 600/150 MHz, 25 °C) mit chemischen Verschiebungen (δ in ppm) und Kopplungskonstanten ($J_{\text{H,H}}$ in Hz) der drei Isomeren von 7dSh (**56a-c**). n.b.: nicht bestimmbar. B) Isomerenverhältnisse der drei Isomere β -Furanose, α -Pyranose und α -Furanose für 7dSh (**56**), Sedoheptulose (**23**) und Sedoheptulose-7-phosphat (**44**).

A	β -Furanose	α -Pyranose	α -Furanose	
	56a	56b	56c	
C-1	62,5	63,9	62,8	
C-2	101,3	97,7	104,5	
C-3	75,8	68,1	82,0	
C-4	74,7	70,9	76,0	
C-5	83,6	69,0	84,8	
C-6	67,7	64,5	66,8	
C-7	17,0	16,9	17,3	
1a-H	3,60	3,68	3,68	
1b-H	3,55	3,42	3,65	
3-H	4,09	3,95	4,08	
4-H	4,23	4,04	4,13	
5-H	3,71	3,60	3,93	
6-H	3,96	4,09	4,01	
7-H	1,22	1,28	1,22	
$^2J_{1\text{a},1\text{b}}$	12,2	11,6	11,9	
$^3J_{3,4}$	7,9	n.b.	4,3	
$^3J_{4,5}$	7,4	n.b.	6,2	
$^3J_{5,6}$	4,4	n.b.	4,0	
$^3J_{6,7}$	6,5	n.b.	6,6	
B				
	7dSh (56); R=H	67 %	18 %	15 %
	23 ; R=OH	64 %	20 %	16 %
	44 ; R=OPO ₃ ²⁻	67 %	16 %	17 %

2.4 Strukturelle Aspekte neuer 7dSh Derivate

Die Entwicklung neuer 7dSh-Analoga im Rahmen der vorliegenden Dissertation basiert unter anderem auf vorangegangener Forschung zu chemischen Synthesen und darauffolgender enzymatischer und biologischer Untersuchungen. So konnte die Komplexität der Synthesen durch die Nutzung des Enzyms Transketolase reduziert werden, was zur schnelleren und effizienteren Darstellung von Analoga führen sollte. Auf Grundlage der Nutzung des Enzyms Transketolase, konzentrierte sich die chemische Synthese der meisten Derivate auf die Darstellung der enzymatisch umsetzbaren Pentosen, welche durch die anschließende chemoenzymatische Synthese zu den jeweiligen Heptulosen umgewandelt wurden. Bei der charakteristischen Transketolase-Reaktion (vgl. Kapitel 1.5), muss die Pentose als C₂-Akzeptor spezifisch an C-2 *R*-konfiguriert sein. Hieraus folgt eine (3*S*, 4*R*)-Heptulose als Endprodukt. Basierend auf den umfangreichen Carbaphosphonat-Forschungen wurden verschiedene Synthesekonzepte und Strategien entwickelt, um ein breitgefächertes Repertoire an Derivaten zu generieren.

Aufgrund dessen, dass 7dSh (**56**) im Gegensatz zu DAHP (**3**) zum Großteil als Furanose im wässrigen System vorliegt, war die Synthese von 7dSh-Analoga, welche bevorzugt als Pyranosen vorliegen, ein Schlüsselkonzept. Ein Syntheseansatz gründete hierbei auf der Änderung der Stereochemie bestimmter chiraler Zentren, bei welchen bekannt ist, dass die entsprechenden unmodifizierten C₇-Zucker bevorzugt in der Pyranose-Form vorliegen. Ein weiterer Ansatz baute auf die Derivatisierung der Hydroxylgruppe an C-5. Dies sollte einen möglichen Ringschluss über diese Gruppe verhindern und somit eine Furanose-Bildung unterbinden.

Ein weiteres Konzept richtete sich auf die Derivatisierung der C-7-Methylgruppe, um die Bedeutsamkeit dieser funktionellen Gruppe für die Aktivität zu bestimmen. Der Austausch einer Phosphatgruppe an C-7 gegen einen Wasserstoff ist keine literaturbekannte Herangehensweise, um einen Inhibitor zu generieren und hebt hiermit die Einzigartigkeit der Methylgruppe von 7dSh (**56**) hervor. Aufgrund dessen ergründet sich in der Derivatisierung der C-7-Methylgruppe eine interessante wissenschaftliche Fragestellung.

Ein weiterer Aspekt greift erneut die Unterschiede zwischen dem eigentlichen Substrat DAHP (**3**) und dem Inhibitor 7dSh (**56**) auf. So besitzt DAHP (**3**) im Vergleich zu 7dSh (**56**) zwei geladene funktionelle Gruppen: Die Carboxylgruppe an C-1, sowie die Phosphatgruppe

an C-7. Diese Ladungsunterschiede zwischen den beiden Verbindungen könnte für eine Minderung der Enzyymbindung und damit der Aktivität von 7dSh (**56**) verantwortlich sein. Da die C-7-Methylgruppe das Alleinstellungsmerkmal dieser neuen Inhibitor-Klasse darstellt, war die Einführung einer Carboxylgruppe an C-1 bevorzugtes Synthesziel.

Eine weitere, in der Wirkstoffforschung aktuell vermehrt angewendete, Derivatisierungsstrategie baute auf dem *Prodrug* Konzept auf. Hierbei sollen durch Derivatisierung die Eigenschaften der Verbindung so abgeändert werden, dass beispielsweise die Aufnahme in die Zelle erleichtert wird. Anschließend findet *in vivo* eine Abspaltung der funktionellen Gruppen statt, was zu einer gezielten Freisetzung der aktiven Verbindung am Zielort führt.

Die abgebildete Übersicht zeigt alle strategisch vorgesehenen und als Syntheseprodukte erzielten Heptulosen im Rahmen dieser Arbeit (Abb. 19).

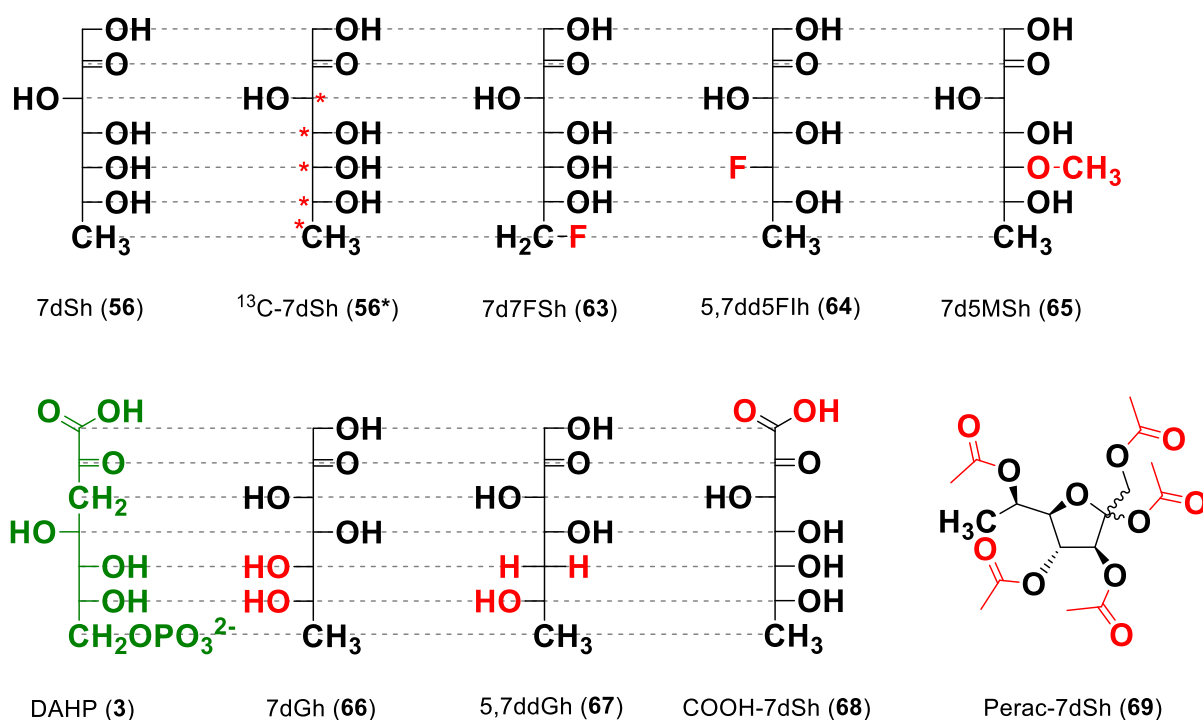


Abbildung 19: Übersicht aller Heptulosen im Rahmen dieser Arbeit, sowie struktureller Vergleich mit DAHP (**3**).

3. Synthese und Analytik von 7dSh (56) und dessen Analoga

3.1 Synthesestrategie A – Ribose als Startverbindung

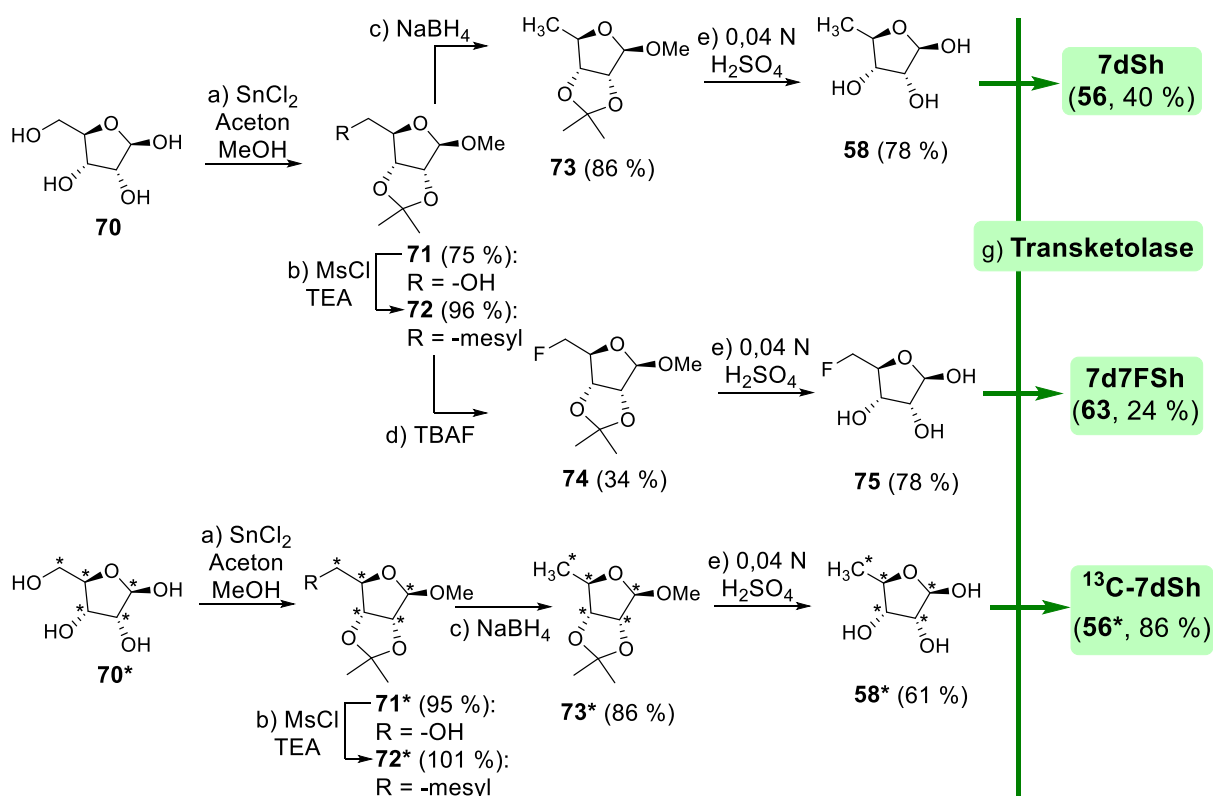


Abbildung 20: Darstellung von 7dSh (56) und 7d7FSh (63) ausgehend von Ribose (70), sowie von ¹³C₅-7dSh (56*) ausgehend von ¹³C₅-Ribose (70*) über Synthesestrategie A.

Synthesestrategie A zielte darauf ab, die eigentliche Leitstruktur 7dSh (56) kostengünstig und effizient in größeren Mengen darzustellen. Des Weiteren sollte das erste Derivat 7d7FSh (63) über ein ähnliches Syntheschema hergestellt werden. Im Rahmen des Kooperationsprojektes „Glykobiotechnologie“ mit RAPP (Arbeitsgruppe FORCHHAMMER), in dem die Biosynthese von 7dSh (56) aufgeklärt werden sollte, wurde zudem ¹³C-markierte 5-Desoxy-ribose (58*) sowie ¹³C-markierte 7dSh (56*) benötigt, welche ebenfalls über diese Syntheseroute dargestellt wurden (Abb. 20). ¹³C-markierte Verbindungen werden im Rahmen dieser Arbeit analog zu ihren nicht markierten Strukturen nummeriert und zusätzlich mit einem Stern „*“ zur Unterscheidung gekennzeichnet. Die Startverbindungen der Synthesestrategie A waren D-Ribose (70) sowie ¹³C₅-D-Ribose (70*) (Abb. 20).

Die Synthese von 5-Desoxy-ribose (58) gründet auf der Darstellung des Zytostatikums Capecitabin (76). Capecitabin (76) ist sowohl ein *Prodrug* als auch ein Antimetabolit, da die aktive Verbindung zum einen erst im Tumor gebildet wird und zum anderen aufgrund seiner

strukturellen Ähnlichkeit zum eigentlichen Substrat einen Stoffwechselweg innerhalb der Tumorzelle hemmt. Capecitabin (**76**) wird aus den drei Bausteinen 1,2,3-Tri-*O*-acetyl-5-desoxy-D-ribose (**77**), 5-Fluorcytosin (**78**) und Chlorameisensäure-*n*-pentylester (**79**) über vier Syntheseschritte dargestellt (Abb. 21).^[75]

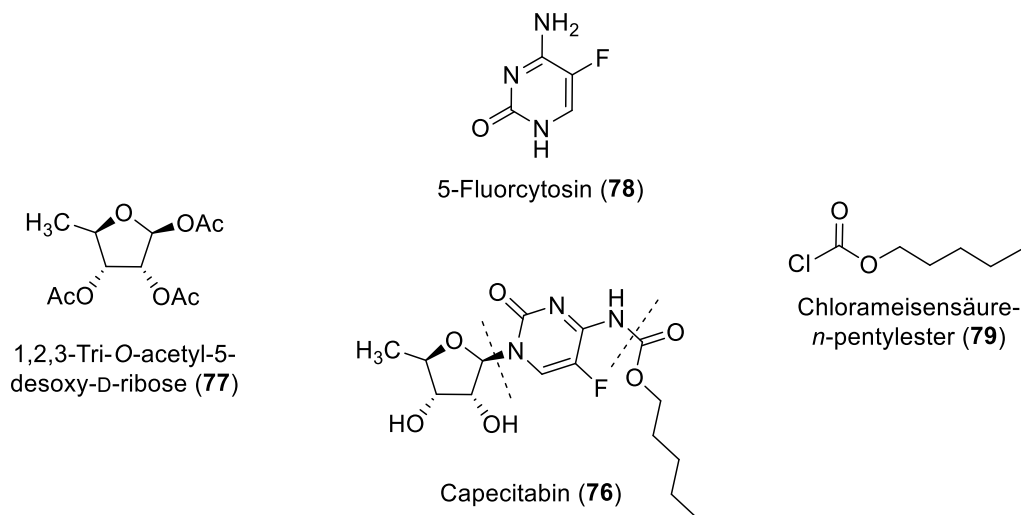


Abbildung 21: Chemische Struktur des Zytostatikums Capecitabin (**76**), sowie dessen drei Eduktbausteine 1,2,3-Tri-*O*-acetyl-5-desoxy-D-ribose (**77**), 5-Fluorcytosin (**78**) und Chlorameisensäure-*n*-pentylester (**79**).

Basierend auf der publizierten Synthese des 5-Desoxy-D-ribose-analogs (**77**) wurde D-Ribose (**70**)/¹³C₅-D-Ribose (**70***) im ersten Schritt unter saurer Katalyse mit Aceton und Methanol geschützt (**71/71***).^[76] Die einzigartige Desoxy-Gruppe an 5-Position wurde im Anschluss durch Einführung der guten Abgangsgruppe Mesylat (**72/72***) über Methansulfonsäurechlorid (MsCl) und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid (NaBH₄) gebildet.^[76-77] Das hieraus erhaltene Produkt Methyl-2,3-*O*-isopropyliden-5-desoxy-ribose (**73/73***) war aufgrund der Kombination aus geringem Molekulargewicht und reduzierter Polarität flüchtig, weshalb die Entfernung des Lösungsmittels Dichlormethan am Rotationsverdampfer unter milden Bedingungen durchgeführt werden musste.

Die Einführung des C-7-Fluoratoms, zur Darstellung der Zielverbindung 7d7FSh (**63**), wurde an Verbindung **72**, durch nucleophile Substitution der Mesylschutzgruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) erreicht, angelehnt an die Synthese von DOWNEY *et al.*^[78] Entschützung der Verbindungen **73/73*** und **74** mit 0,04 N H₂SO₄ bei 85 °C ergab die Desoxy-Pentosen **58/58*** und **75**.^[76] Diese konnten nach anschließender Aufreinigung über die optimierte chemoenzymatische Reaktion (Kapitel 2.2) mittels Transketolase in die jeweiligen Desoxy-Heptulosen **56/56*** und **63** umgesetzt werden. Im Falle der ¹³C-angereicherten 7dSh (**56***) wurde lediglich nicht-¹³C-angereichertes Hydroxypyruvat (**46**) verwendet, somit waren nur die Kohlenstoffatome C-3 bis C-7 markiert.

Dieser Umstand war für den Einsatzzweck der Aufklärung der Biosynthese von 7dSh (**56**) vonnöten. Das Verhältnis der Isomere für die Verbindung $^{13}\text{C}_5$ -7dSh (**56***) war identisch zur nicht-angereicherten 7dSh (**56**) mit 67 % β -Furanose, 18 % α -Pyranose und 15 % α -Furanose (Tab. 1).

Die Anzahl an Isomeren für die Verbindung 7d7FSh (**63**) konnte zusätzlich über das ^{19}F -NMR-Spektrum bestätigt werden, da hier lediglich drei ^{19}F -NMR-Signale detektiert wurden. Das Isomeren-Verhältnis betrug für dieses Derivat 68 % β -Furanose, 18 % α -Pyranose und 14 % α -Furanose.

Die Analytik der ^{13}C -markierten Verbindungen erwies sich aufgrund der nun hinzukommenden Kopplungen der ^{13}C -Kohlenstoffatome, sowohl im Protonenspektrum als auch im Kohlenstoffspektrum, als besonders interessant und zugleich sehr komplex. Aufgrund der natürlichen Häufigkeit von 1,1 % für ^{13}C -Kohlenstoff ist eine Entkopplung im Protonenspektrum normalerweise nicht nötig, da die sogenannten Satellitensignale aus der ^1H - ^{13}C -Kopplung aufgrund ihrer geringen Intensität in der Auswertung und Interpretation der Spektren normalerweise keinen Einfluss haben. Die hinzukommende $^1\text{J}_{\text{H,C}}$ -Kopplung im ^1H -NMR-Spektrum erbrachte eine Aufspaltung der vorhandenen Signale um 140-180 Hz, was zu weiteren Überlagerungen führte. Zudem war die Integration ganzzahliger Protonen nicht mehr möglich, was zu Integralen mit 0,5-facher Protonenanzahl führte. (Abb. 22).

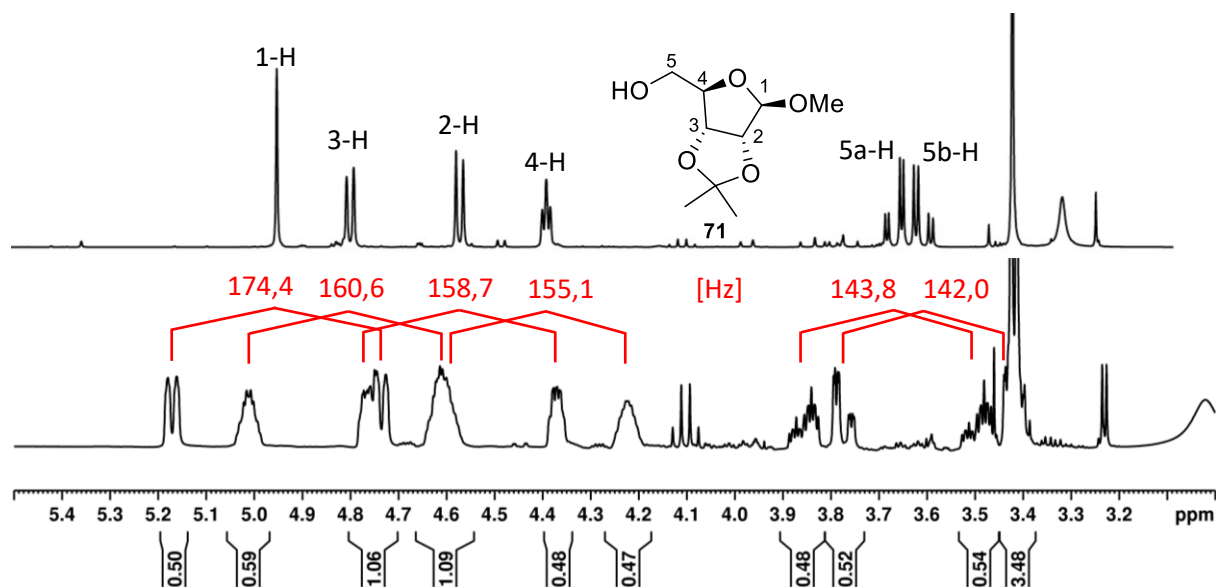


Abbildung 22: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (CDCl_3 , 400 MHz, 25 °C) von **71** und dessen ^{13}C -markiertem Pendant **71*** zeigen die zusätzliche Aufspaltung der Signale aufgrund der $^1\text{J}_{\text{H,C}}$ -Kopplung (rot hervorgehoben).

Die Interpretation der ^{13}C -NMR-Spektren wurde aufgrund der erfolgreichen Anreicherung und hieraus folgenden ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen ebenfalls zusätzlich komplexer. Hinzu kam, dass funktionelle Gruppen wie die eingeführten Schutzgruppen keine ^{13}C -Anreicherung besaßen, da mit unmarkierten Reagenzien gearbeitet wurde. Somit waren die Signalintensitäten der eingeführten Kohlenstoffatome, wie beispielsweise der Methoxy-Schutzgruppe im ^{13}C -NMR-Spektrum um den Faktor 90 geringer, Verunreinigungen mit ^{13}C -Anreicherung hingegen deutlich höher, trotz real geringerer Anteile (Abb. 23). Dies machte eine Abschätzung der Reinheit über das ^{13}C -NMR-Spektrum komplex. Eine Abschätzung wurde deshalb über das ^1H -NMR-Spektrum vorgenommen.

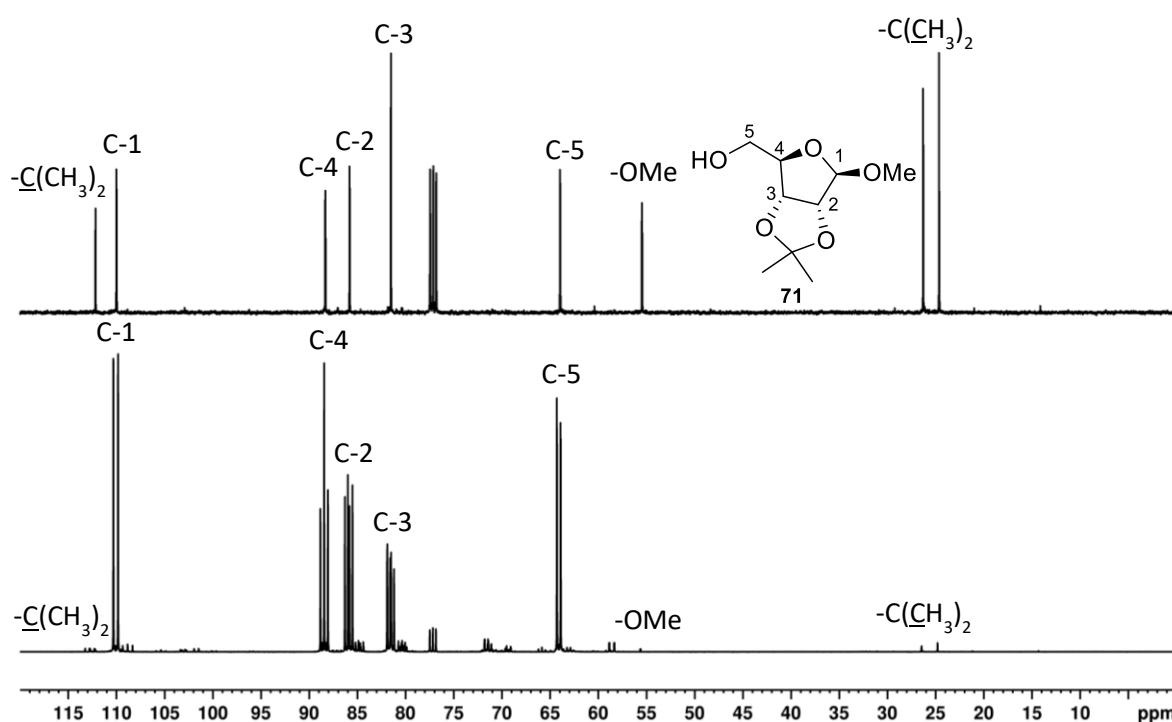


Abbildung 23: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (CDCl₃, 100 MHz, 25 °C) von **71** (oben) und dessen ^{13}C -markiertem Pendant **71*** (unten). Aufgrund der ^{13}C -Anreicherung sind die ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen im Spektrum von **71*** ersichtlich. Zudem sind die Intensitäten unmarkierter Signale (-C(CH₃)₂; -OMe und -C(CH₃)₂) deutlich geringer.

3.2 Synthesestrategie B – Erzwingung der Pyranose-Form

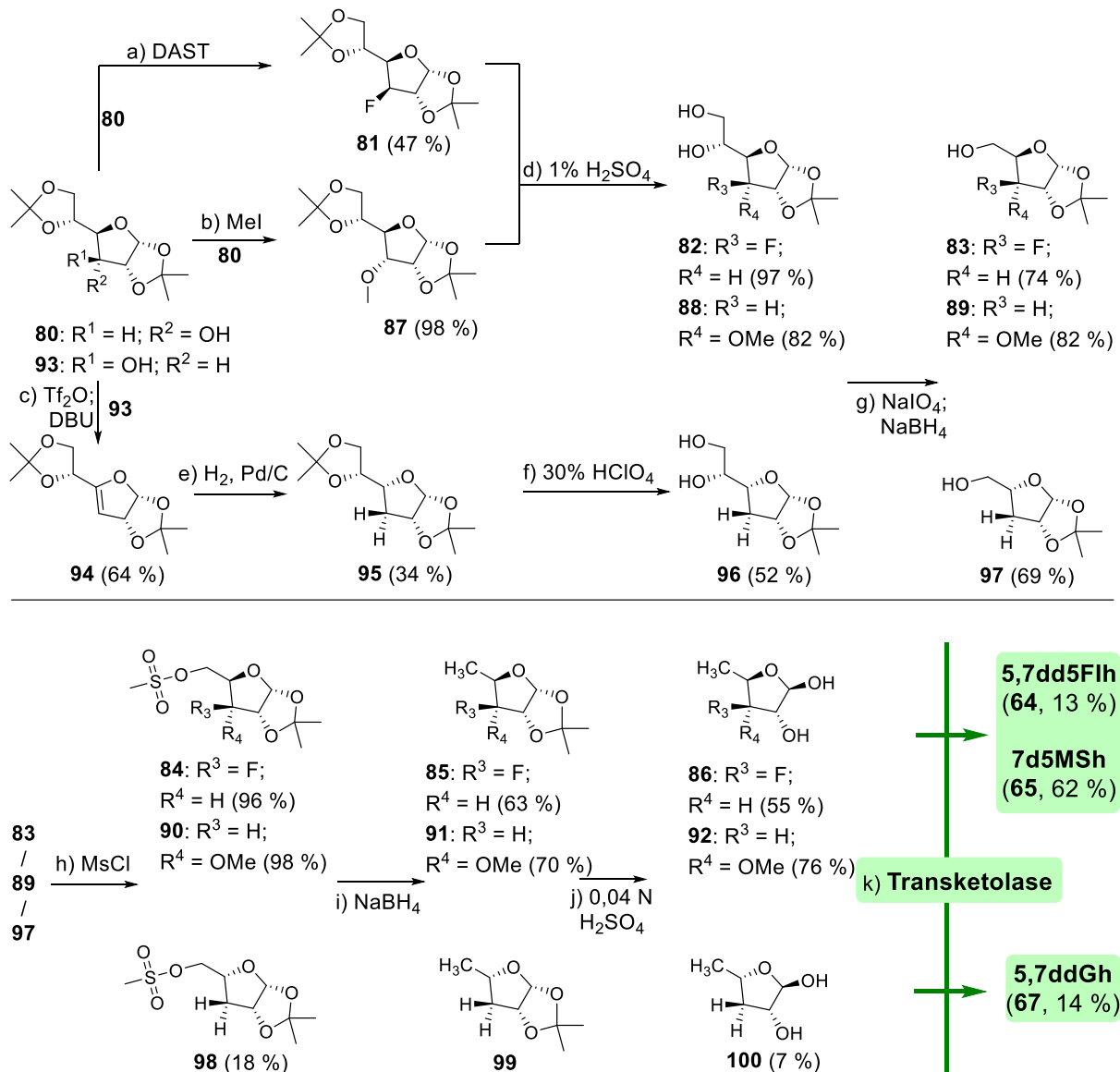


Abbildung 24: Darstellung von 5,7dd5Flh (**45**), 7d5MSh (**46**) und 5,7ddGh (**48**) über Synthesestrategie B.

Synthesestrategie B hatte zum Ziel 7-Desoxy-heptulosen darzustellen, welche keinen Ringschluss über die Hydroxylgruppe an C-5 eingehen können und somit gezwungen sind als Pyranosen vorzuliegen. Im Rahmen dieser Arbeiten entstanden in diesem Zusammenhang die Derivate: 5,7dd5Flh (**64**), 7d5MSh (**65**) und 5,7ddGh (**67**). Startverbindungen waren hierbei die beiden doppelt Acetonid geschützten Hexosen Allose (**80**) und Glucose (**93**), angelehnt an literaturbekannte Synthesen.^[79-83] Infolge der zweifachen Acetonidschätzung war eine direkte Derivatisierung der C-3 Position des Furanose-Gerüsts möglich (Abb. 24). Diese C-3 Position ist aufgrund der Transketolase-Reaktion zur Heptulose die endgültige C-5 Position des Endproduktes (Abb. 14).

Im Falle von 5,7dd5FIh (**64**) fand eine Substitution der C-3 Hydroxylgruppe in **80** durch ein Fluoratom statt. Um die identische Stereochemie an C-5 wie im Falle von 7dSh (**56**) zu erhalten, wäre Diacetonglucose (**93**) die korrekte Startverbindung gewesen. Hierfür wurden mehrere Syntheseveruche unternommen: Identische Fluorierung wie im Falle von 7d7FSh (**63**), über Einführung der guten Abgangsgruppe Mesylat und anschließender nukleophiler Substitution mit TBAF führte nicht zum gewünschten Produkt. Einführung der noch besseren Abgangsgruppe Triflat über Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf₂O) und anschließender Substitution über CsF erbrachte ebenfalls keine Fluorierung.^[83] Ein weiterer Syntheseveruch ging über die direkte Umsetzung mit dem Fluorierungsreagenz DAST (**103**),^[84] wobei auch diese Variante nicht zum Erfolg führte (Abb. 25). Mittels DC-Reaktionskontrolle konnte jedoch in den meisten Fällen die Bildung eines Hauptproduktes festgestellt werden. Aufreinigung und anschließende Strukturaufklärung mittels LC-HRMS und NMR wiesen auf eine Dehydratisierung statt einer nukleophilen Substitution, was zu Olefin **94** führte (Abb. 24). Eingehende Literaturrecherche bestätigte die Probleme der Substitution der C-3 Hydroxylgruppe von Diacetonglucose (**93**).^[85] Aufgrund dessen wurde von Diacetonallose (**80**) gestartet, wissend dass somit das entgegengesetzte (*S*)-konfigurierte Produkt erhalten wird. Mittels dieser Anpassung konnte erfolgreich die fluorierte Pentose **81**, angelehnt an die Synthese von MTASHOBYA, dargestellt werden.^[79]

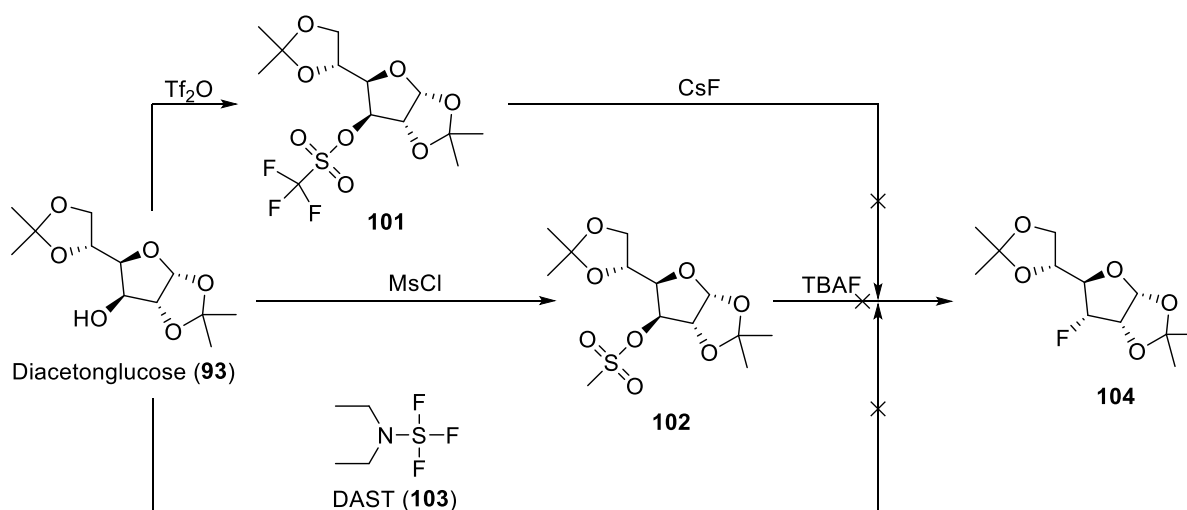


Abbildung 25: Syntheseveruche zur Darstellung von 3-Fluor-diacetonallose (**104**).

7d5MSh (**65**) wurde ebenfalls ausgehend von Diacetonallose (**80**) dargestellt. Die Modifikation an C-3 wurde durch direkte Umsetzung der doppelt geschützten Hexose mit Methyljodid (MeI) erreicht. Dies führte zur Methylierung dieser Position unter Erhalt der

Stereochemie wodurch erfolgreich Pentose **87** nach einer modifizierten Synthese von SHARMA *et al* dargestellt werden konnte.^[80]

Eine weitere Verbindung, welche im Rahmen dieser Synthesestrategie dargestellt wurde, war das Derivat 5,7ddGh (**67**). Startpunkt war Diacetonglucose (**93**), welche im ersten Schritt mit Tf₂O umgesetzt wurde, was die Triflatgruppe als gute Abgangsgruppe einführte. Direkte Umsetzung mit Diazabicycloundecen (DBU) führte zur, für die Fluorierung vorher noch ungewollten, Dehydratisierung und somit Einführung einer Doppelbindung, analog zur Synthese von HUSSAIN *et al.*^[81] Anschließende Hydrierung, basierend auf der Synthese von PAWAR *et al*, mit H₂, Pd/C ergab Diaceton-3-desoxy-L-gulose (**95**).^[82]

Von diesem Synthesepunkt aus ist das anschließende Vorgehen aller drei Derivate **81**, **87** und **95** nahezu identisch, was die Vorteile dieses neu etablierten Weges zu C-5 modifizierten 7dSh-Analoga untermauert. Selektive Entschützung der 5,6-*O*-Isopropyliden-Gruppe unter milden Reaktionsbedingungen, angelehnt an die Literatur (1 % H₂SO₄, MeOH, 24 h; Abb. 24, Schritt d), erbrachten die freien vicinalen Hydroxylgruppen an C-5 und C-6.^[83] Im Falle der 3-Desoxygulose **95** führten diese Reaktionsbedingungen jedoch zu einer vollständigen Entschützung beider Acetonidgruppe, was zu 3-Desoxy-L-gulose führte. Um dies zu unterbinden und die bestmögliche Ausbeute des einfach entschützten Produktes **96** zu erhalten, wurden eine Vielzahl an Reaktionsbedingungen untersucht. Veränderte Parameter waren unter anderem Temperatur, Reaktionszeit und die Wahl des Protonendonors. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind nicht aufgeführt, da die literaturbekannte Umsetzung mit 30 % Perchlorsäure bei 0 °C und kürzerer Reaktionsdauer das beste Ergebnis lieferte. Anhand dieser Bedingungen konnte das gewünschte, einfach entschützte Produkt **96** erhalten werden.^[82]

Mit den synthetisierten Hexosen **82**, **88** und **96** konnte durch oxidative Spaltung mit Natriumperiodat der Zugang zur Chemie der Pentosen erhalten werden. Eine direkt anschließende Reduktion des an C-5 gebildeten Aldehyds zur Hydroxylgruppe mit NaBH₄ erbrachte die Pentosen **83**, **89** und **97** angelehnt an LIU *et al.*^[83] Somit konnte ab diesem Punkt analog zu Synthesestrategie A vorgegangen werden: Einführung der guten Mesyl-Abgangsgruppe und anschließende Reduktion mit NaBH₄ erbrachte erneut die einzigartige Desoxygruppe an C-5.^[76] Wie schon zuvor musste im Falle der 3-Desoxy-Variante (**98**) von den Standardbedingungen (85 °C) abgewichen werden, da der Umsatz, welcher mittels Dünnschichtchromatographie überwacht wurde, zu gering ausfiel (Abb. 26). Die Einführung

einer besseren Abgangsgruppe, wie z.B. dem Triflat sorgte ebenfalls für keine Verbesserung des Umsatzes. Stattdessen konnte eine Rückreaktion zur freien Hydroxylgruppe festgestellt werden. Literaturrecherche bestätigte diese experimentell erhaltene Triflat-Abspaltung.^[76] Einzig höhere Temperaturen (100 °C) erbrachten bei der Reduktion mit NaBH₄ den geschützten Desoxyzucker **99** (Abb. 26).

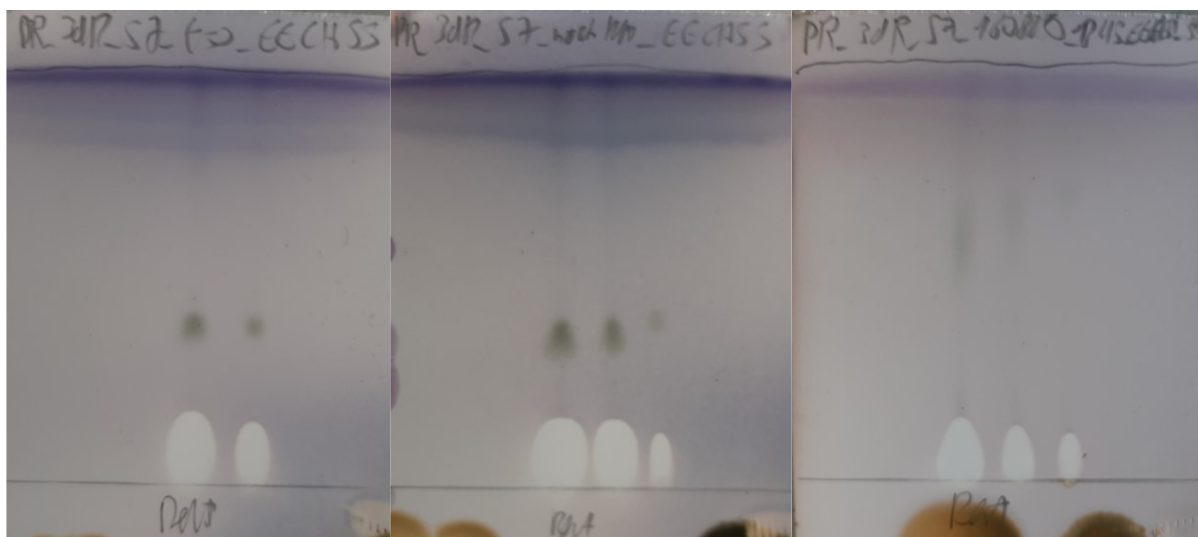


Abbildung 26: Reaktionskontrolle der Synthese von **99**. Links: Reaktionsstart, Edukt $R_f \approx 0,4$; Mitte: 85 °C Reaktionstemperatur; Rechts: 100 °C Reaktionstemperatur, Produkt $R_f \approx 0,6$. Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (5:5), Anfärbereagenz: Anisaldehyd.

Aufgrund des geringen Molekulargewichtes, sowie der Entfernung polarer, funktioneller Gruppen, in Kombination mit der Maskierung der polaren Hydroxylgruppen mittels Acetonidschätzung, war das Didesoxy-Derivat **99** überaus flüchtig. Infolge dieses Sachverhaltes, gepaart mit der geringen Substanzmenge (709 mg von Edukt **98**) wurde diese Verbindung ohne vorherige analytische Untersuchung direkt entschützt. Nach Analyse der 3-Fluor- und 3-Methoxy-Verbindungen **85** und **91** wurden diese ebenfalls entschützt. Dies erbrachte die Desoxy-Pentosen **86**, **92** und **100**, welche nach Aufreinigung anschließend über die chemoenzymatische Reaktion in die jeweiligen Desoxy-Heptulosen **64**, **65** und **67** überführt werden konnten.

Abhängig von der jeweiligen Desoxy-Heptulose wurden unterschiedliche Aufreinigungsschritte angewendet. Im Falle von 7d5MSh (**65**) war lediglich eine MPLC-Aufreinigung vonnöten (NP-Kieselgel). Mittels NMR konnte bestätigt werden, dass der Reinstoff 7d5MSh (**65**) in wässriger Lösung zu 82 % als α -Pyranose und 18 % als β -Pyranose vorliegt. Somit konnte eindeutig eine Furanose-Bildung unterbunden werden. Alleinstellungsmerkmal dieser Verbindung war das Vorliegen als weißer, kristalliner Feststoff. Alle weiteren Desoxy-Heptulosen waren, wie schon 7dSh (**56**), hochviskose Öle.

Die Verbindung 5,7dd5FIh (**64**) wurde über MPLC, gefolgt von einer semipräparativen HPLC, aufgereinigt (Hi-Plex Ca-Säule). Die NMR-Charakterisierung wies sowohl im ^1H - wie auch im ^{19}F - und im ^{13}C -NMR-Spektrum auf das Vorliegen von drei Isomeren, was nicht zu erwarten war, da eine Furanose-Bildung ausgeschlossen sein sollte (Abb. 27). Das ^{13}C -NMR-Signal bei 212 ppm deutete auf eine Ketogruppe. Vollständige Auswertung bestätigte das Vorliegen der offenkettigen Keto-Form, mit einem Anteil von ca. 20 %. Bei den restlichen 80 % handelte es sich um die gewollte Pyranose-Struktur, wobei sich diese in die beiden Anomere mit Anteilen von 60 % und 20 % aufteilte, hierbei war eine konkrete Zuordnung in α - oder β -Form nicht zweifelsfrei möglich.

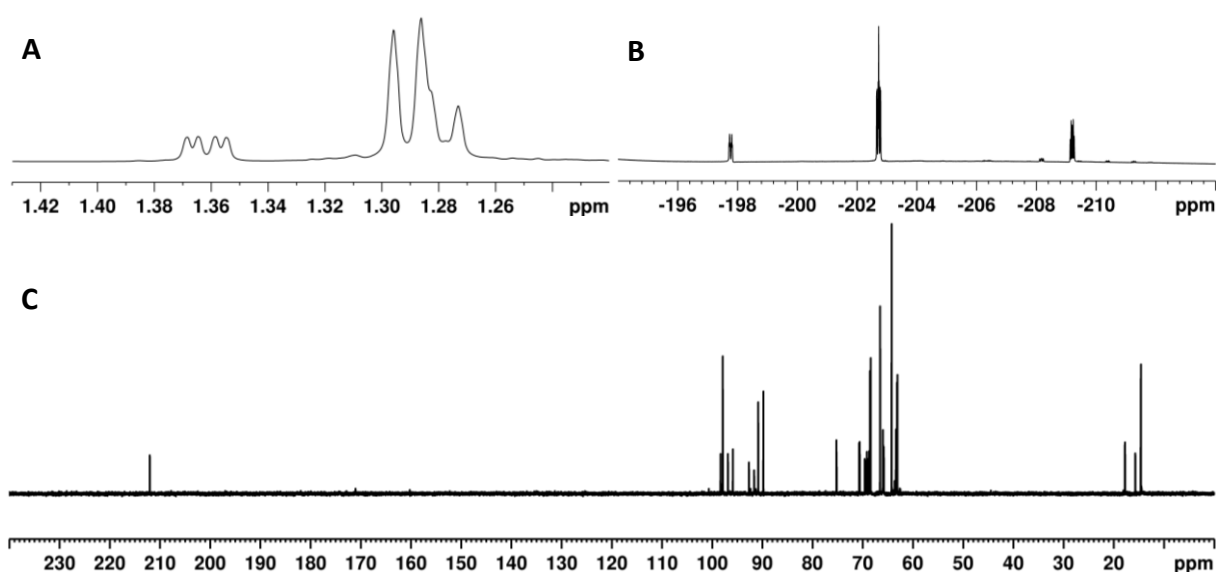


Abbildung 27: NMR-Analyse von 5,7dd5FIh (**64**). A) ^1H -NMR-Ausschnitt (D_2O , 700 MHz, 25 °C) zeigt die charakteristische Methylgruppe, sowie das Vorhandensein dreier Isomere. B) ^{19}F -NMR-Ausschnitt (D_2O , 659 MHz, 25 °C) zeigt ebenso drei Isomere. C) Vollständiges ^{13}C -NMR-Spektrum (D_2O , 176 MHz, 25 °C) mit charakteristischem Signal bei 212 ppm.

Die Aufreinigung der Verbindung 5,7ddGh (**67**) erwies sich als am aufwändigsten. MPLC, gefolgt von HPLC konnte die meisten Desoxy-Heptulosen zuverlässig aufreinigen. Im Falle von 5,7ddGh (**67**) wurde jedoch nach MPLC-Aufreinigung im NMR-Spektrum das Vorhandensein einer zusätzlichen Komponente festgestellt, die eindeutig als Isomer ausgeschlossen werden konnte. Das Verhältnis von Nebenkomponente zu Syntheseprodukt war ca. 6,5:1, was somit einem großen Anteil dieser unbekanntes Komponente entsprach. Folgende Signale konnten der unbekanntes Verbindung zugeordnet werden: ^1H -NMR $\delta(\text{ppm}) = 3,79$ (tt, 6,5 Hz, 4,4 Hz); 3,66 (dd, 11,7 Hz, 4,4 Hz); 3,56 (dd, 11,7 Hz, 6,5 Hz); ^{13}C -NMR $\delta(\text{ppm}) = 72,0$; 62,5 (Abb. 28). Das Verhältnis der NMR-Protonensignale war 1:2:2; im ^{13}C -NMR-Spektrum konnte ein 1:2 Verhältnis abgeschätzt werden. Literaturrecherche und eine genauere Betrachtung der chemoenzymatischen Stufe erbrachten

die Aufklärung der Verunreinigung. Es handelte sich hierbei um Glycerin (**105**), welches in einer 50 %-igen Mischung mit deionisiertem Wasser zur Lagerung des Enzyms Transketolase verwendet wurde (s. Kapitel 2.2).

Das Glycerin (**105**) mittels HPLC vom Produkt **67** abzutrennen wurde im analytischen Maßstab getestet, hierfür wurde Glycerin (**105**) als Reinsubstanzen injiziert. Anschließend wurde eine geringe Menge des verunreinigten Produktes **67** injiziert. Als chromatographische Trennsäule wurde die Spezialsäule Hi-Plex Ca verwendet. Die beiden Verbindungen coeluierten, was eine Abtrennung des Glycerins (**105**), mittels der zur Verfügung stehenden Trennsäule, ausschloss. Da sowohl MPLC- als auch HPLC-Aufreinigung keine Abtrennung des Glycerins (**105**) zur Folge hatte, wurde mittels DC eine optimierte Kieselgelsäule etabliert (Normalphase; Chloroform/Methanol (8:2)). Hierdurch konnte glycerinfreies 5,7ddGh (**67**) erhalten werden. Das Isomeren-Verhältnis konnte mittels NMR-Spektroskopie mit 100 % α -Pyranose bestimmt werden.

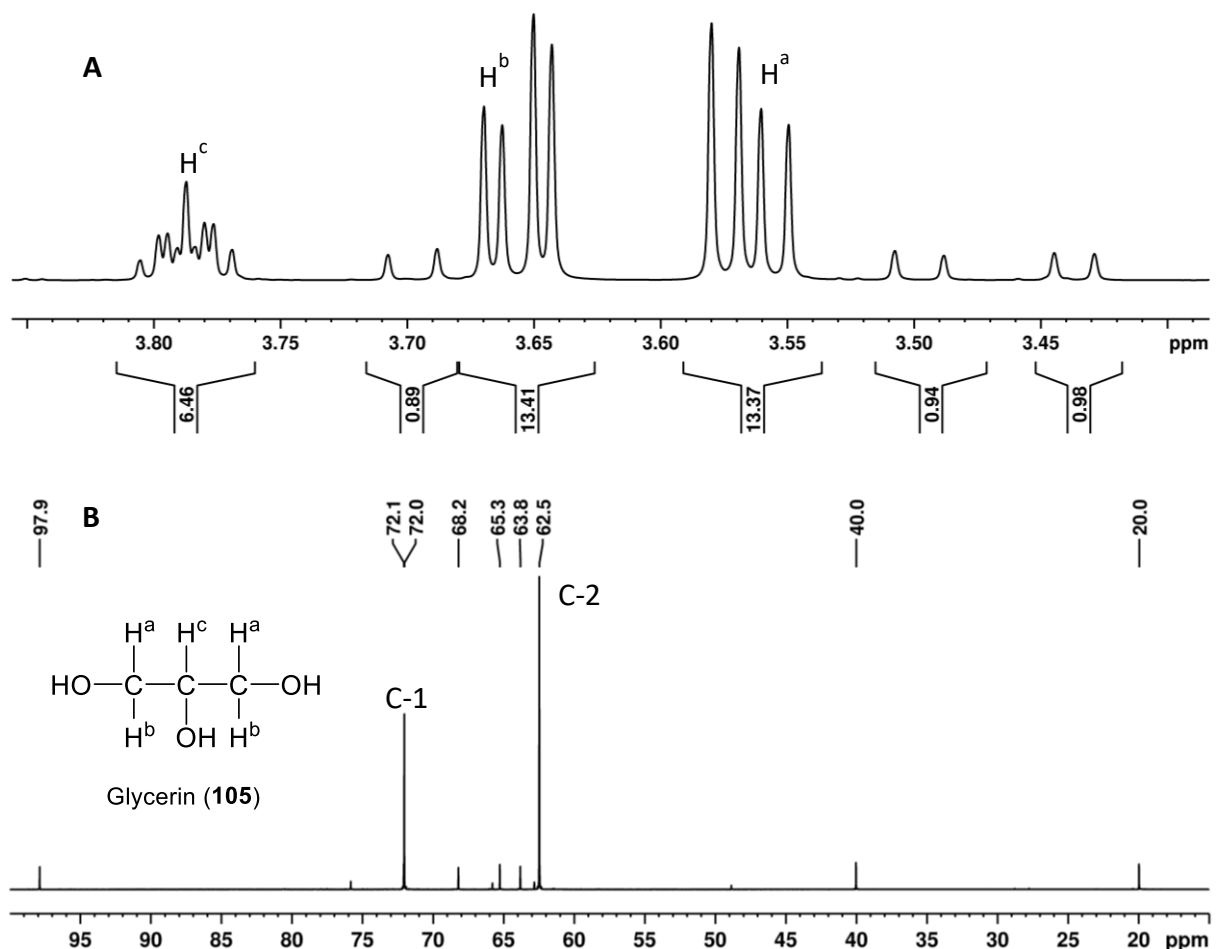


Abbildung 28: NMR-Analyse von 5,7ddGh (**67**). A) $^1\text{H-NMR}$ -Ausschnitt (D_2O , 600 MHz, 25 °C) zeigt Glycerin (**105**) als Verunreinigung bei 3,79; 3,66 und 3,56 ppm. B) $^{13}\text{C-NMR}$ -Ausschnitt (D_2O , 150 MHz, 25 °C) zeigt ebenfalls Glycerin (**105**) als Verunreinigung bei 72,0 und 62,5 ppm.

3.3 Weitere Synthesen neuer 7dSh-Analoga

3.3.1 7-Desoxy-L-glucoheptulose (7dGh, 66)

Die Verbindung 7-Desoxy-L-glucoheptulose (7dGh, **66**) wurde im Rahmen des Kooperationsprojektes „Glykobiotechnologie“ von RAPP (Arbeitsgruppe FORCHHAMMER), ausgehend von kommerziell erhältlicher 5-Desoxy-L-arabinose (**106**) durch direkte Umsetzung mittels Transketolase, dargestellt (Abb. 29).^[86] Die NMR-spektroskopische Analyse des Produktes **66** war Bestandteil dieser vorliegenden Dissertation in der Chemie. Passend zur unmodifizierten Glucoheptulose^[27] konnte das vollständige Vorliegen der Verbindung in der α -Pyranose-Form nachgewiesen werden. Eine genauere Betrachtung der vorliegenden Konformationen aller synthetisierten Verbindungen ist in Kapitel 3.4 aufgeführt.

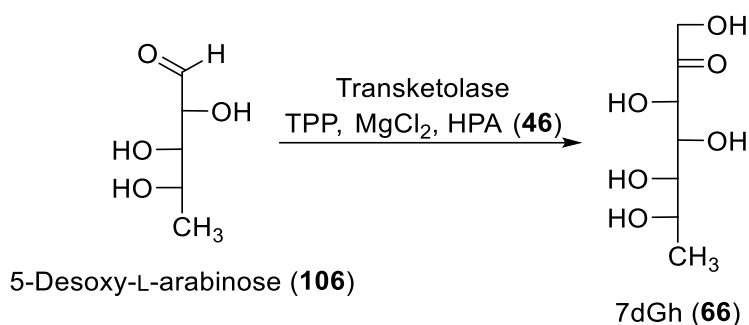


Abbildung 29: Darstellung von 7dGh (**66**) ausgehend von 5-Desoxy-L-arabinose (**106**) und Hydroxypyruvat (**46**). Synthese durchgeführt durch RAPP.

3.3.2 COOH-7dSh (68)

Aufgrund der enzymatischen Synthesestrategie mittels Transketolase war die Einführung einer Carboxylgruppe an C-1 erst nach der chemoenzymatischen Reaktion möglich. Somit war die Oxidation der Hydroxylgruppe an C-1 zur Carboxylgruppe der plausibelste Ansatz. Aufgrund der Anzahl an Hydroxylgruppen, sowie deren räumlichen Anordnung konnte eine differenzierte Schützung der restlichen Gruppen nicht durchgeführt werden. Alleinstellungsmerkmal der Hydroxylgruppe an C-1 ist, dass es sich hierbei um die einzige primäre Hydroxylgruppe innerhalb der Verbindung handelt. Literaturrecherche zur selektiven Oxidation von Monosacchariden, sowie von α -Hydroxyketonen zeigte mögliche Synthesestrategien auf. Synthesestrategie 1 war an die Synthese von Schleimsäure (**108**), ausgehend von D-Galactose (**107**), angelehnt. Hierbei kann durch Kochen der D-Galactose (**107**) in 4,8 N HNO₃ eine Oxidation von C-1 und C-6 zur jeweiligen

Carbonsäure erreicht werden (Abb. 30A).^[87] Somit werden mittels dieser Synthese lediglich die primären funktionelle Gruppen, also der Aldehyd an C-1 und die Hydroxylgruppe an C-6, oxidiert. Da 7dSh (**56**) eine 7-Desoxyketose ist, sollte lediglich die primäre Hydroxylgruppe an C-1 bis zur Carbonsäure oxidiert werden. Die Durchführung der Reaktion im Labor, überprüft mittels DC und LC-HRMS, erbrachte jedoch keinen Umsatz. Zudem konnte 7dSh (**56**) als Edukt ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden.

Synthesestrategie 2 folgte der Oxidation von 2-Hydroxyacetophenon (**109**) zu Phenylglyoxylsäure (**110**). Die Oxidation findet im wässrigen Milieu unter Einsatz eines Phasentransfer-Katalysators (PEG400) mit Wasserstoffperoxid und Bromwasserstoff statt (Abb. 30B).^[88] Großer Unterschied zu 7dSh (**56**) ist das fehlende aromatische System. Zudem ist das Vorliegen von 7dSh (**56**) in seiner offenkettigen Form, in wässriger Lösung, analog zu anderen Monosacchariden sehr gering. Diese Synthesestrategie führte ebenfalls nicht zum Erfolg.

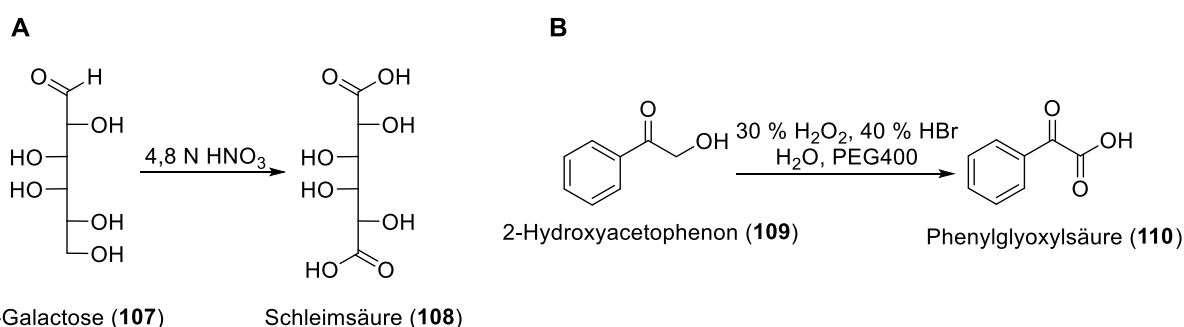


Abbildung 30: Syntheseüberblick literaturbekannter Oxidationen von funktionellen Gruppen zu Carboxylgruppen. A) Synthese von Schleimsäure (**108**) ausgehend von D-Galactose (**107**).^[87] B) Synthese von Phenylglyoxylsäure (**110**) ausgehend von 2-Hydroxyacetophenon (**109**).^[88]

Synthesestrategie 3 orientierte sich an der Synthese von 2-Keto-L-gulonsäure (2-KLG, **113**), ausgehend von L-Sorbose (**111**) (Abb. 31A).^[89] Diese Reaktion ist Teil der patentierten REICHSTEIN-Synthese, welcher für die industrielle Herstellung von Ascorbinsäure (Vitamin C), ausgehend von Glucose, verwendet wird.^[90] Die Oxidation findet über O₂-Katalyse im Beisein eines „Modifiers“ statt. Die kritischen Parameter dieser Reaktion sind hierbei die Selektivität, sowie die Reaktionsgeschwindigkeit. Die zwei genannten Faktoren sind stark pH abhängig, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem pH-Wert zunimmt, wohingegen die Selektivität abnimmt. Somit ist das pH-Optimum eingeschränkt. Zusätzlich findet mit steigendem pH-Wert eine Zersetzung des Produktes 2-KLG (**113**) unter den Reaktionsbedingungen statt. Ein pH-Wert von 7,3 wurde schließlich speziell für diese Verbindungen als optimal definiert. Als Katalysator wurde zu Beginn der Forschung Pd/C getestet, wobei eine schnelle Desaktivierung des Katalysators der Fall war. Eine Regeneration

des Katalysators war hierbei nicht möglich. Ein Wechsel des Edelmetalls hin zu Pt bremste die Desaktivierungsgeschwindigkeit. Pt/Al₂O₃ und Pt/C lieferten die besten Ergebnisse, wobei Pt/C in Selektivität und Umsatzrate überlegen war. Um sowohl die Selektivität wie auch die Reaktionsgeschwindigkeit weiter zu steigern, wurden verschiedene tertiäre Amine als *Modifier* untersucht. Der *Modifier* adsorbiert hierbei an der Pt-Oberfläche und bildet während der Reaktion einen Komplex mit dem Edukt, wodurch die Oxidation an C-1 präferiert ist. Die besten Ergebnisse konnten mit Urotropin (**112**) als *Modifier* erhalten werden. Zusätzliche Variablen sind das molare Verhältnis von *Modifier* zu Edukt, welches für diese Reaktion ein Optimum von 1:1700 hatte und zusätzlich das Katalysator:Edukt-Massenverhältnis mit 0,27:1.^[91] 7dSh (**56**) und L-Sorbose (**111**) sind beides Ketosen, wobei L-Sorbose (**111**) zwei primäre Hydroxylgruppen besitzt und 7dSh (**56**) lediglich eine. Zudem ist die Stereochemie der beiden Verbindungen teilweise abweichend, was sich auf die Funktionsweise des *Modifiers* auswirken könnte (Abb. 31B). Zudem wurde in der Literatur die Theorie aufgestellt, dass L-Sorbose (**111**) in der Pyranose-Form, komplexiert am Urotropin (**112**), oxidiert wird.^[91] Dies erschwert den theoretischen Vergleich mit 7dSh (**56**) weiter.

Der Syntheseablauf ist in mehrere Zwischenschritte untergliedert. Im ersten Schritt findet eine *in situ* Herstellung des modifizierten Katalysators statt. Hierbei wird der Katalysator unter Schlenk-Bedingungen mit Wasserstoff reduziert, was eine Aktivierung der Platinoberfläche gewährleisten soll. Anschließend wird unter N₂-Atmosphäre der *Modifier* zugegeben und für 90 min gerührt, um eine gleichmäßig modifizierte Pt-Oberfläche zu erhalten. Im zweiten Schritt findet die eigentliche Oxidation des Edukts statt. Der modifizierte Katalysator wird in wässriger Lösung auf 50 °C erhitzt. Anschließend wird das Edukt zugegeben und der pH-Wert auf ca. 7.3 eingestellt. Da hier, wie im Falle der Transketolase-Reaktion, keine pH-Stat-Apparatur zur Verfügung stand, konnte der pH-Wert nur einmalig mittels Na₂CO₃ eingestellt werden. Durch Austausch der N₂-Atmosphäre mit Sauerstoff wurde die Reaktion initialisiert. Nach 7,5 h wurde die Reaktion beendet. DC-Analyse des Reaktionsgemisches bestätigte einen geringen Reaktionsumsatz (Abb. 31C).

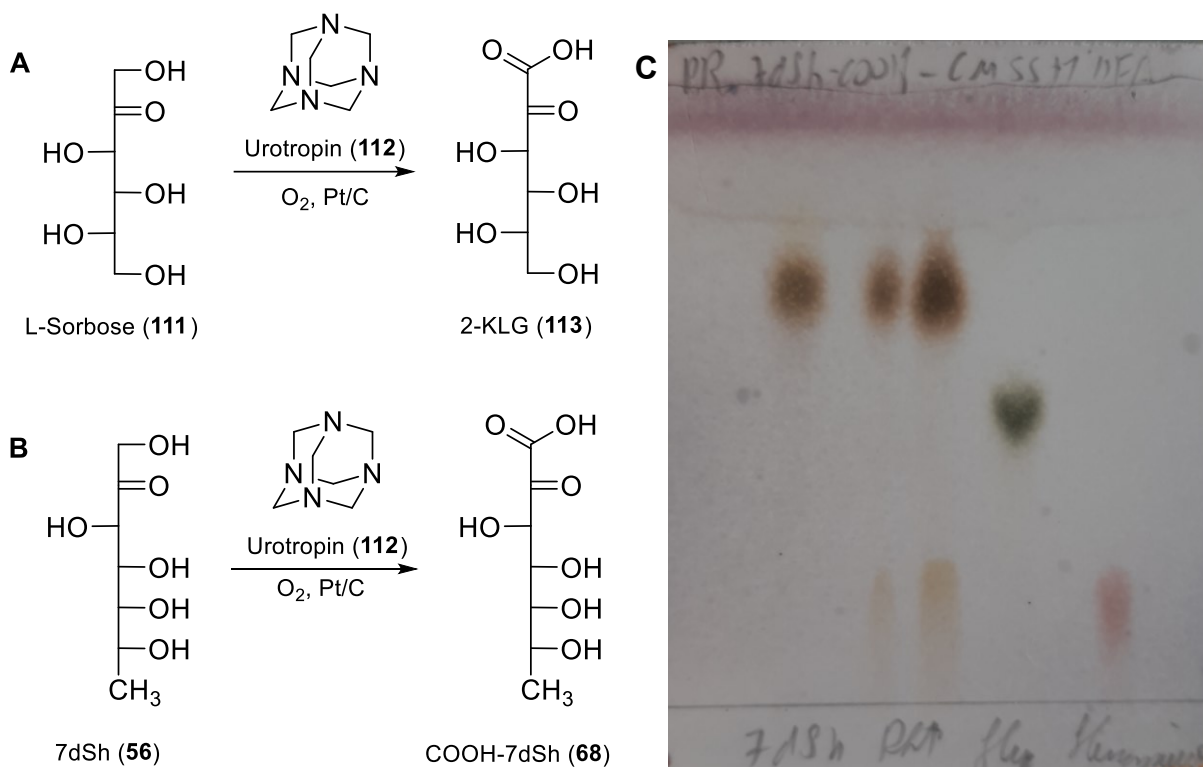


Abbildung 31: A) Literaturbekannte Synthese von 2-KLG (113) aus L-Sorbose (111) durch Oxidation mit O_2 , Pt/C und Urotropin (112) als *Modifier*.^[89-91] B) Synthese von COOH-7dSh (68) ausgehend von 7dSh (56), analog zur Synthese von 2-KLG (112). C) Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle der Synthese von COOH-7dSh (68) nach 7,5 h. v.l.n.r.: Edukt 56 als Referenz, Reaktionsmischung (2x), Glucose, Glucuronsäure. Laufmittelgemisch: Chloroform/Methanol 5:5 + 1 % Ameisensäure.

Chromatographische Aufreinigung mittels Kieselgelsäule, gefolgt von einer anschließenden HPLC ermöglichte die Trennung von Edukt und Produkt. Die NMR-Analyse bestätigte das Vorhandensein des oxidierten Produktes. Jedoch konnten die beiden Signale bei 8,45 ppm im ^1H -NMR-Spektrum und 171,0 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht dem Produkt zugeordnet werden (Abb. 32A). Literaturrecherche bestätigte, dass es sich hierbei um das Formiatsalz aus der Kieselgel-Aufreinigung handelte.^[92] Hier wurde mit 1 % Ameisensäure in der mobilen Phase gearbeitet, da sonst eine starke Verbreiterung des Produktsignals in den vorherigen DC-Optimierungen ersichtlich war. Die Verwendung eines Ionentauschers war keine Option, da eine Adsorption der ohnehin schon geringen Produktmenge ausgeschlossen werden sollte. Aufgrund dessen wurde das Produktgemisch in Reinstwasser gelöst und der pH von ursprünglich 8,9 auf ca. 2,8 mittels 0,1 N Salzsäure herabgesetzt. Die hierbei gebildete Ameisensäure konnte mittels Lyophilisation entfernt werden. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt. Das entstandene Chloridsalz wurde abgetrennt, indem das trockene Produkt erst in Methanol aufgenommen und anschließend mittels eines PVDF-Filters (Polyvinylidenfluorid) filtriert wurde. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Chlorid in Methanol konnten so die enthaltenen Chloridsalze abgetrennt werden. Das Produkt

COOH-7dSh (**68**) lag wie 7dSh (**56**) in drei verschiedenen Formen mit den Verhältnissen 68 % β -Furanose, 22 % α -Furanose und 10 % α -Pyranose vor (Abb. 32B).

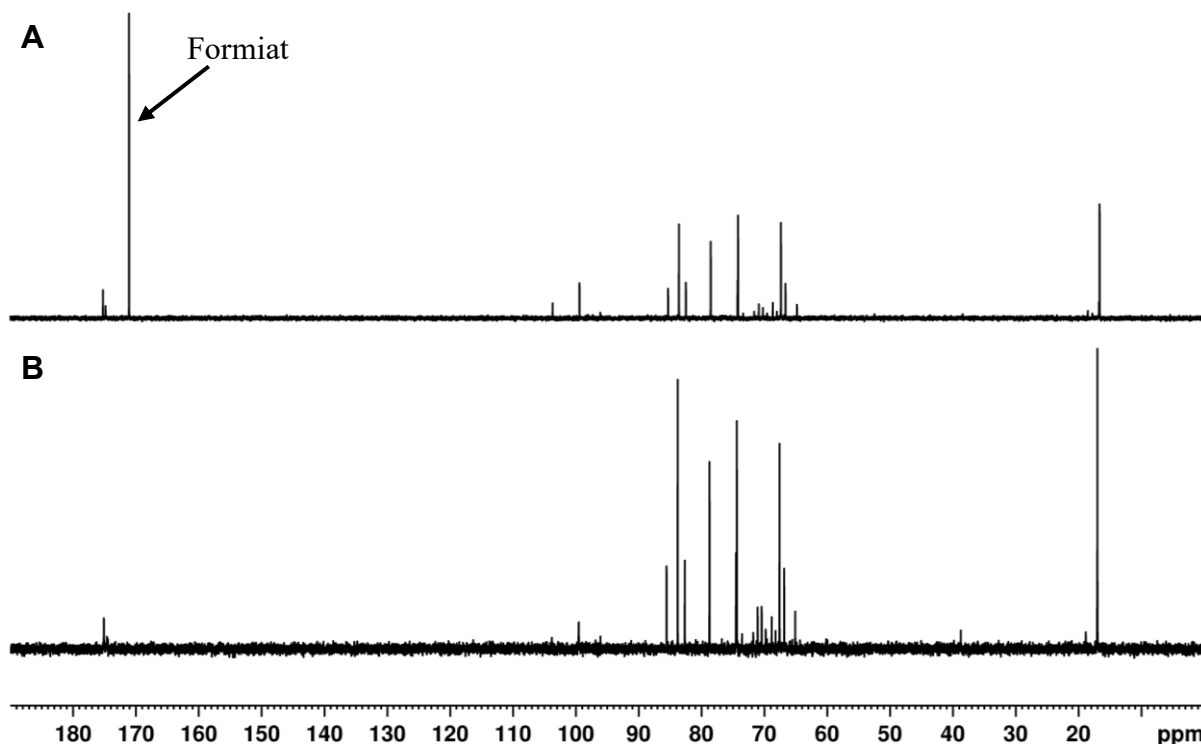


Abbildung 32: NMR-Analyse (D₂O, 150 MHz, 25 °C) von COOH-7dSh (**68**). A) ¹³C-NMR-Spektrum nach chromatographischer Aufreinigung über Kieselgel und HPLC. Formiat Verunreinigung bei 171 ppm markiert. B) ¹³C-NMR-Spektrum nach beschriebener Lyophilisation. Formiat konnte vollständig entfernt werden.

3.3.3 Perac-7dSh (**69**)

Die hohe Polarität von 7dSh (**56**), aufgrund seiner Monosaccharid-Struktur, verhindert eine passive Membrandurchlässigkeit (s. Ampicillin (**52**), Kapitel 1.6).^[48], weshalb die Verbindung aktiv über Transporter in die Zelle aufgenommen werden muss. RAPP bestätigte die Bedeutung des aktiven Transportes für die Aufnahme und Aktivität von 7dSh (**56**) gegen Cyanobakterien (s. Kapitel 4.1).^[93]

Aufgrund dieses Aufnahmeproblems von 7dSh (**56**) in biologische Zellen, sollte auf das *Prodrug*-Design zurückgegriffen werden. Allgemein existieren eine Vielzahl an Möglichkeiten der Derivatisierung funktioneller Gruppen (vgl. Kapitel 1.6). Eine Veresterung der Hydroxylgruppen sollte beispielsweise eine deutliche Verringerung der Polarität bringen. Eine wichtige Einschränkung ist hierbei, dass die Ester innerhalb der Zelle enzymatisch oder chemisch abgebaut werden können und dass zudem die freiwerdenden Säuren keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zellen haben. Eine Peracetylierung der Hydroxylgruppen erschien als sehr lohnenswerte Strategie für einen ersten *Prodrug*-Ansatz. Unter

Peracetylierung wird die vollständige Acetylierung aller freien Hydroxylgruppen einer Verbindung bezeichnet. Die Peracetylierung von 7dSh (**56**) würde somit einer Pentaacetylierung entsprechen, da unabhängig vom Isomer immer fünf freie Hydroxylgruppen existieren. Die Peracetylierung von Kohlenhydraten unterscheidet sich abhängig davon, ob es sich um Aldosen oder Ketosen handelt, da Aldosen einfacher peracetyliert werden können. Standardbedingungen für Aldosen sind wasserfreies Pyridin als Lösungsmittel und ca. 2 Äquivalente Essigsäureanhydrid pro Hydroxylgruppe. Im Falle von Ketosen wird zudem zumeist 0,1 Äquivalent DMAP als Katalysator zugegeben.^[94] Eine Peracetylierung von 7dSh (**56**) basierend auf diesen Bedingungen wurde nach vorherigen Untersuchungen an Fructose (**120**) analog angewendet. Die LC-HRMS Analyse der Reaktionsmischung nach Extraktion bestätigte die peracetylierte/ pentaacetylierte 7dSh (Perac-7dSh, **69**) als Hauptkomponente. Lediglich geringe Mengen an tri- und tetraacetylierter 7dSh konnten nachgewiesen werden. Zusätzlich gab es jedoch noch ein weiteres Signal mit späterer Elutionszeit und mit geringfügig niedrigerer Intensität als Perac-7dSh (**69**), welches zu Beginn nicht zugeordnet werden konnte (Abb. 33). Aufgrund der Hochauflösung des Massenspektrometers war eine direkte Bestimmung der Summenformel des unbekanntes Signals möglich. Es hatte im Vergleich zu Perac-7dSh (**69**) eine zusätzliche Masse von C_2H_2O . Literaturrecherche bestätigte die Möglichkeit einer Endiol-Struktur, welche im Falle von Fructose (**120**) auftreten kann und somit eine zusätzliche Acetylierung ermöglicht.^[95] Dies würde einer hexaacetylierten 7dSh (Hexaac-7dSh, **114**) entsprechen.

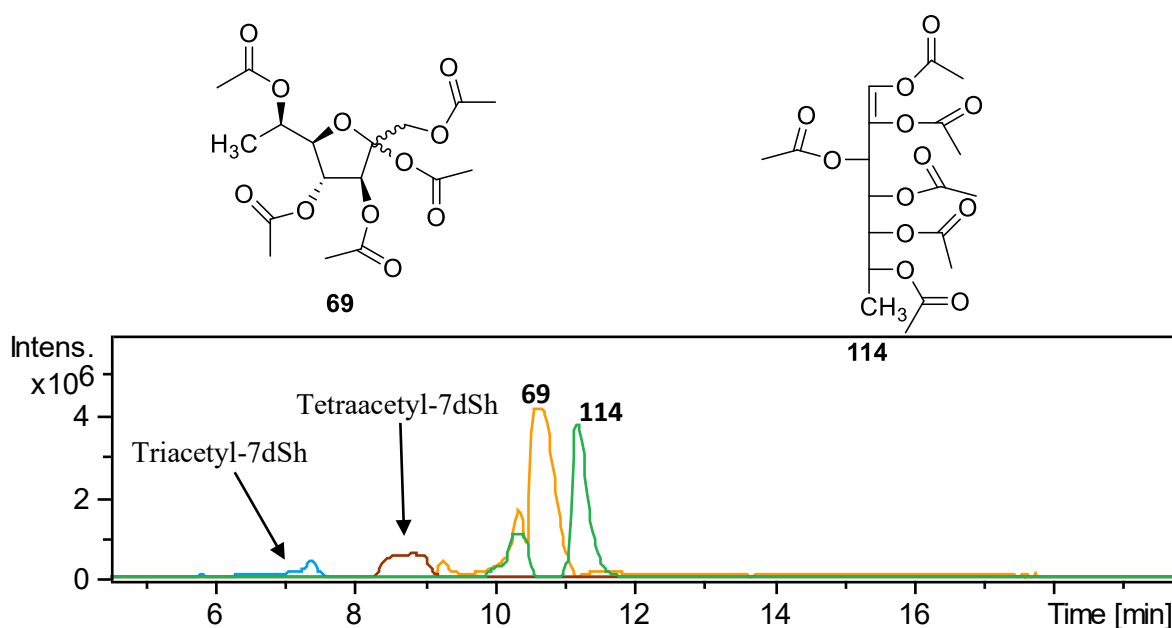


Abbildung 33: HPLC-MS Analyse der Synthese von Perac-7dSh (**69**). Abgebildet sind die *Extracted ion Chromatogramme* (EICs) von Triacetyl-7dSh (Blau), Tetraacetyl-7dSh (Rot), Perac-7dSh (Orange, **69**) und Hexaac-7dSh (Grün, **114**).

Weitere Aufreinigung der acetylierten Mischung mittels optimierter HPLC-Bedingungen, ermöglichte die Trennung der perac- und hexaacetylierten 7dSh (**69**, **114**), was eine separate NMR-Strukturaufklärung ermöglichte. Hierdurch konnten die beiden Strukturen eindeutig verifiziert werden. Im Falle der Hexaac-7dSh (**114**) konnte nur ein Spektrensatz und somit nur ein Isomer festgestellt werden. Die ^{13}C -NMR-Signale bei 128,4 und 129,6 ppm im Hexaac-7dSh (**114**) Spektrum bestätigten zudem das Vorliegen der Doppelbindung und damit die Endiol-Struktur (Abb. 34D-F). Im Falle der Perac-7dSh (**69**) war hingegen erneut eine Aufspaltung der Verbindung in die drei 7dSh üblichen Isomere (**56a** – **56c**) zu erkennen. Zur Bestätigung der Strukturen sind die drei Methyl-Signale der ursprünglichen 7dSh-Struktur im ^1H -NMR-Bereich 1,15-1,25 ppm und im ^{13}C -NMR-Bereich 15-18 ppm sowie die drei Ketal-Signale bei 100-110 ppm hervorzuheben (Abb. 34A-C). Das Isomeren-Verhältnis wurde mit 61 % α -Furanose, 31 % β -Pyranose und 8 % β -Furanose bestimmt. Da eine Umwandlung zwischen den Isomeren nach der Acetylierung nicht mehr möglich ist, muss davon ausgegangen werden, dass eine getrennte Aufreinigung dieser Verbindungen mittels HPLC lediglich aufgrund der sehr ähnlichen Polaritäten hier nicht gelungen ist.

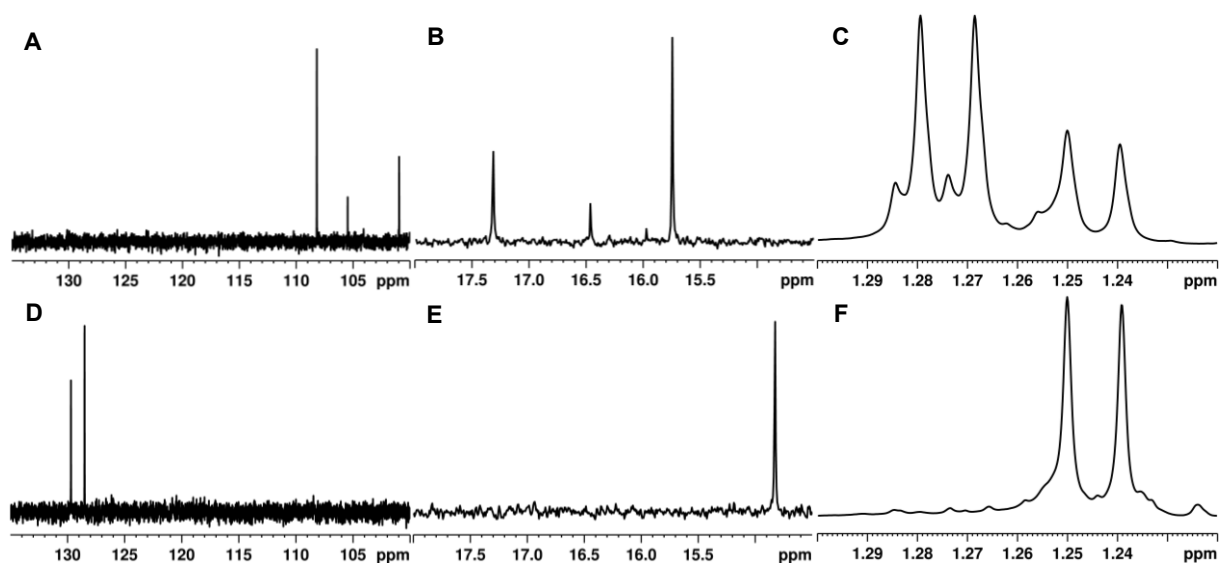


Abbildung 34: NMR-spektroskopischer Vergleich (D_2O , 600/150 MHz, 25 °C) von Perac-7dSh (**69**) und Hexaac-7dSh (**114**). A) ^{13}C -NMR-Signale der Ketalgruppen der drei Isomere von Perac-7dSh (**69**). B) ^{13}C -NMR-Signale der Methylgruppen der drei Isomere von Perac-7dSh (**69**). C) ^1H -NMR-Signale der Methylgruppen der drei Isomere von Perac-7dSh (**69**). D) ^{13}C -NMR-Signale der Endiol-Kohlenstoffatome von Hexaac-7dSh (**114**). E) ^{13}C -NMR-Signal der Methylgruppe von Hexaac-7dSh (**114**). F) ^1H -NMR-Signal der Methylgruppe von Hexaac-7dSh (**114**).

3.4 Bestimmung der Konformation von 7dSh (56) und dessen Analoga (63 – 68)

Um eine genauere Analyse der verschiedenen Syntheseprodukte basierend auf dem Mechanismus der DHQS vorzunehmen, wurden die Konformationen der einzelnen Verbindungen in wässriger Lösung mittels NMR in D₂O bestimmt. Für die Pyranose-Formen, welche in diesem Fall relevant sind, betrachten wir die beiden Sesselkonformationen ⁵C₂ und ²C₅ (Abb. 35). Insgesamt existieren jedoch 38 mögliche charakteristische Konformere für die Pyranose-Struktur, wobei die beiden Sesselkonformationen die mit Abstand häufigsten sind. Die hier genannte Schreibweise zur Unterscheidung der beiden Konformationen projiziert eine Ebene durch die Pyranose-Struktur, so dass vier der sechs Ringatome in der genannten Ebene sind. Die beiden Kohlenstoffatome, welche über und unter der Ebene sind, definieren die Konformation, wobei das Kohlenstoffatom über der Ebene hochgestellt geschrieben wird und das unter der Ebene tiefgestellt geschrieben wird.^[96] Welche Konformation vorliegt, hängt von der freien Energie ab, welche so niedrig wie möglich sein sollte und von verschiedenen Parametern abhängt. Einflussfaktoren sind unter anderem stereoelektronische Effekte, wie der Anomere Effekt, aber auch die Größe von funktionellen Gruppen, was dazu führt, dass große Reste meist äquatorial statt axial angeordnet sind.^[97] Die NMR-Spektroskopie ist prädestiniert für die Bestimmung der Konformation, da die Konformation Einfluss auf mehrere Diederwinkel im Molekül nimmt. Aufgrund dessen, dass der Diederwinkel über die Karplus-Beziehung mit der ³J_{H-H}-Kopplung zusammenhängt, kann hierüber die jeweilige Konformation einer jeden Pyranose bestimmt werden, sofern ³J_{H-H}-Kopplungen vorhanden und bestimmbar sind.^[98-99] Abhängig vom jeweiligen Stereoisomer und dem dazugehörigen Konformer unterscheiden sich die Diederwinkel, weshalb für jedes Konfigurationsisomer eine eigene Betrachtung durchgeführt werden muss. Näherungsweise existieren zwei verschiedene Diederwinkel in der Pyranose-Form. Zum einen die typische gauche oder synklinale Geometrie mit einem Diederwinkel von ca. 60° und zum anderen die trans oder antiperiplanare Geometrie mit einem Diederwinkel von ca. 180°. Im Falle der gauche Geometrie wird eine Kopplungskonstante von 2-4 Hz erwartet und im Falle der trans Geometrie von 7-10 Hz.^[100-101] Die drei Kopplungskonstanten ³J_{3,4}; ³J_{4,5} und ³J_{5,6} sind konformationsabhängig und können somit, zur korrekten Zuordnung herangezogen werden. Abbildung 35 zeigt beispielhaft an der α-Pyranose-Form des Derivats 7d5MSh (65), die beiden möglichen Konformere, sowie die jeweiligen Protonen, passend zu den genannten drei Kopplungskonstanten und damit einhergehenden die theoretischen Winkel. Die mittels NMR

bestimmten Kopplungskonstanten sind wie folgt: ${}^3J_{3,4} = 3,8$ Hz; ${}^3J_{4,5} = 3,1$ Hz und ${}^3J_{5,6} = 10$ Hz. Diese Werte entsprechen, aufbauend auf der Karplus-Beziehung, einer 5C_2 -Konformation.^[100]

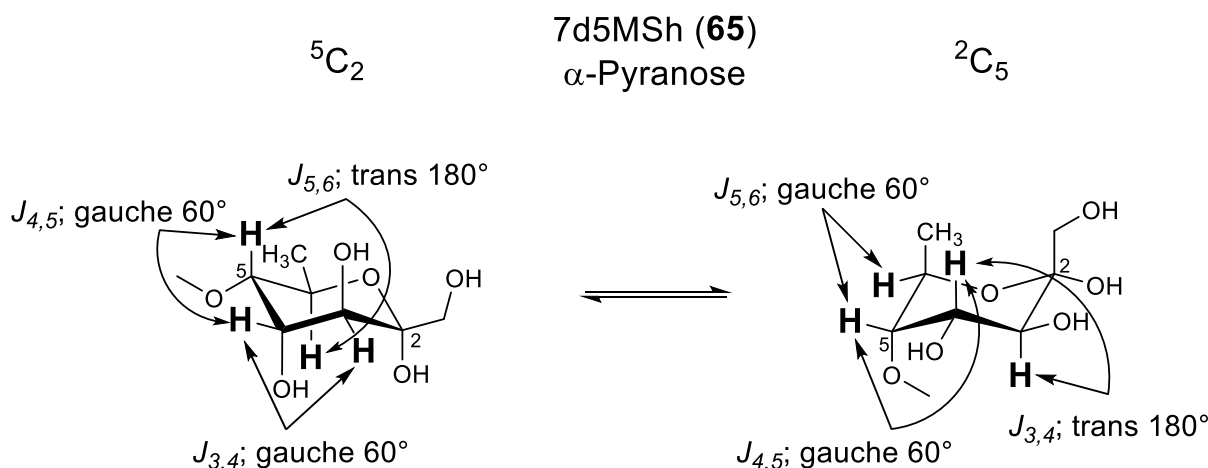

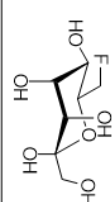
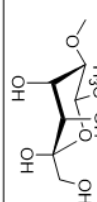
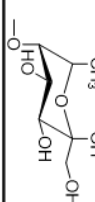
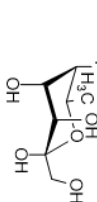
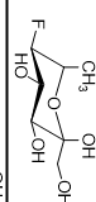
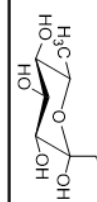
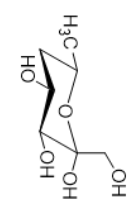


Abbildung 35: Vergleich der beiden Konformationen 5C_2 und 2C_5 am Beispiel der α -Pyranose von 7d5MSh (**65**). Alle relevanten Diederwinkel zur Bestimmung der Konformation sind dargestellt.

Nachfolgend ist in Tabelle 2 eine detaillierte Auswertung aller relevanten Verbindungen zusammengefasst, wobei zum einen die theoretischen Kopplungskonstanten für die jeweilige Konformation dargestellt sind und zum anderen die gemessenen Kopplungskonstanten, sowie die daraus ableitbaren Konformationen mit Strukturformeln. DAHP (**3**), als eigentliches Substrat der DHQS, liegt laut Kristallstruktur im aktiven Zentrum in der 5C_2 Konformation vor.^[13] Die eigens durchgeführten NMR spektroskopischen Untersuchungen dieser Verbindung in D_2O bestätigen diese Konformation auch in wässriger Lösung. Im Falle der α -Pyranose-Form der Verbindungen 7dSh (**56**) und COOH-7dSh (**68**) konnte keine Konformation ermittelt werden, da aufgrund der starken Überlagerung der Signale im 1H -NMR-Spektrum keine der nötigen Kopplungskonstanten zweifelsfrei bestimmbar waren. Jedoch konnte für die α -Pyranose-Form der Verbindung 7d7FSh (**63**) die Kopplungskonstante $J_{5,6} = 10,6$ Hz ermittelt werden, was für eine 5C_2 Konformation spricht. Dies ist plausibel, da hierdurch die Hydroxymethylgruppe als größter Rest äquatorial am Anomeren Zentrum ausgerichtet ist. Der geringe strukturelle Unterschied zwischen 7d7FSh (**63**) und 7dSh (**56**) / COOH-7dSh (**68**) lässt darauf schließen, dass die beiden Verbindungen mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls in der 5C_2 Konformation vorliegen. Wie stark der Anomere Effekt Einfluss auf die Konformation haben kann, ist im Falle von 7d5MSh (**65**) ersichtlich. Hier kann anhand der Kopplungskonstanten für die α -Pyranose-Form eine 5C_2 Konformation bestimmt werden, wohingegen für die β -Pyranose-Form eine 2C_5 Konformation nachweisbar ist. Wie anhand von Abbildung 35 ersichtlich, existieren – exklusive der Reste am Anomeren

Zentrum – insgesamt zwei axiale Reste und zwei äquatoriale Reste. Durch Konformationsänderung würde eine Inversion der Ausrichtung stattfinden, was jedoch am Verhältnis axial zu äquatorial keine Änderung ergeben würde. Somit entscheidet ausschließlich die Hydroxymethylgruppe am Anomeren Zentrum über die Konformation, wobei die äquatoriale Ausrichtung aufgrund sterischer Effekte bevorzugt ist. Das gleiche Ergebnis ist für die Verbindung 5,7dd5FIh (**64**) nachweisbar, für die jedoch nur allein anhand der NMR-Spektren nicht zwischen α - und β -Form unterschieden werden konnte. Da jedoch erneut davon ausgegangen werden kann, dass die Hydroxymethylgruppe eine äquatoriale Ausrichtung bevorzugt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit die 5C_2 Konformation der α -Pyranose-Form zugeordnet werden. Für die Verbindung 7dGh (**66**) ist eine eindeutige 2C_5 Konformation auszumachen, was bedeutet, dass alle Reste äquatorial ausgerichtet sind. Die Verbindung 5,7ddGh (**67**) besitzt, ähnlich zu DAHP (**3**), eine Desoxy-Gruppe an einem Kohlenstoffatom, welches relevant für die Ermittlung der Konformation ist. Hieraus ergeben sich insgesamt fünf verschiedene Kopplungskonstanten, welche zusammenfassend, identisch zu 7dGh (**66**), für eine 2C_5 Konformation sprechen. Die hier erhaltenen Daten können für eine spätere Analyse der Aktivitäten der Verbindungen am isolierten Enzym zu Hilfe genommen werden. Das Beispiel DAHP (**3**) dass, die Konformation im aktiven Zentrum identisch zur Konformation der Verbindung in Lösung sein kann.

Tabelle 2: NMR-spektroskopische Auswertung der Kopplungskonstanten von 7dSh (**56**) und dessen Analoga, sowie von DAHP (**3**) als Substrat der DHQS, zur Bestimmung der Konformation. Pyr: Pyranose, n.b.: nicht bestimmbar.

Verbindung / Isomer	Theoretische Konformation		Gemessen Kopplungskonstanten	Reale Konformation
	⁵ C ₂	² C ₅		
DAHP (3) α-Pyr	<i>J</i> _{3a,4} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{3b,4} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{4,5} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{5,6} trans→7-10 Hz	<i>J</i> _{3a,4} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{3b,4} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{4,5} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{5,6} gauche→2-4 Hz	<i>J</i> _{3a,4} =11,8 Hz; <i>J</i> _{3b,4} =5,2 Hz <i>J</i> _{4,5} =9,5 Hz <i>J</i> _{5,6} =9,7 Hz	
	7dSh (56) α-Pyr		n.b.	n.b.
COOH-7dSh (68) α-Pyr			n.b.	n.b.
7d7FSh (63) α-Pyr	<i>J</i> _{3,4} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{4,5} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{5,6} trans→7-10 Hz	<i>J</i> _{3,4} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{4,5} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{5,6} gauche→2-4 Hz	<i>J</i> _{5,6} =10,6 Hz	
7d5MSH (65) α-Pyr			<i>J</i> _{3,4} =3,8 Hz; <i>J</i> _{4,5} =3,1 Hz; <i>J</i> _{5,6} =10,0 Hz	
7d5MSH (65) β-Pyr			<i>J</i> _{3,4} =9,4 Hz; <i>J</i> _{4,5} =3,3 Hz; <i>J</i> _{5,6} =2,6 Hz	
5,7dd5Flh (64) α/β-Pyr	<i>J</i> _{3,4} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{4,5} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{5,6} gauche→2-4 Hz	<i>J</i> _{3,4} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{4,5} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{5,6} gauche→2-4 Hz	<i>J</i> _{3,4} =3,4 Hz	
	5,7dd5Flh (64) β/α-Pyr		<i>J</i> _{3,4} =9,2 Hz; <i>J</i> _{4,5} =7,4 Hz	
7dGh (66) α-Pyr	<i>J</i> _{3,4} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{4,5} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{5,6} gauche→2-4 Hz	<i>J</i> _{3,4} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{4,5} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{5,6} trans→7-10 Hz	<i>J</i> _{3,4} =9,6 Hz <i>J</i> _{4,5} =9,4 Hz <i>J</i> _{5,6} =9,7 Hz	
5,7ddGh (67) α-Pyr	<i>J</i> _{3,4} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{4,5a} = <i>J</i> _{4,5b} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{5a,6} = <i>J</i> _{5b,6} gauche→2-4 Hz	<i>J</i> _{3,4} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{4,5a} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{4,5b} trans→7-10 Hz <i>J</i> _{5a,6} gauche→2-4 Hz <i>J</i> _{5b,6} trans→7-10 Hz	<i>J</i> _{3,4} =9,5 Hz; <i>J</i> _{4,5a} =5,0 Hz; <i>J</i> _{4,5b} =11,6 Hz <i>J</i> _{5a,6} =2,0 Hz; <i>J</i> _{5b,6} =12,6 Hz	

4. Biologische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden umfangreiche biologische Untersuchungen an 7dSh (**56**) und dessen synthetisierten Analoga (**63** – **69**) durchgeführt. Die Arbeiten untergliedern sich in *in vivo* Untersuchungen am Cyanobakterium *A. variabilis* und in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen an der Modellpflanze *A. thaliana*. Die hier gewonnenen Daten sollen tiefere Einblicke und ein tieferes Verständnis zur Struktur-Wirkungs-Beziehung der chemisch-synthetisch dargestellten Desoxyheptulosen bringen.

Neben den synthetisierten Verbindungen konnten vier verschiedene Carbaphosphonate (**C1** – **C4**) über eine Kooperation mit der Firma BASF SE erhalten werden. Bei diesen vier Verbindungen handelt es sich um das namensgebende Carbaphosphonat selbst (**C1**, **10**), welches als potente Vergleichssubstanz in den biologischen Untersuchungen herangezogen werden kann. Bei den anderen Carbaphosphonaten **C2** – **C4** handelt es sich um *Prodrug* Derivate, welche entweder an der Carbonsäure oder der Phosphonatgruppe Veresterungen aufweisen (Abb. 36). Carbaphosphonat **C2** (**115**) besitzt im Gegensatz zu **C1** (**10**) einen Diisopropylphosphonatester. Carbaphosphonat **C3** (**116**) enthält sowohl die Diisopropylveresterung als auch eine Methylveresterung der Carbonsäure. Carbaphosphonate **C4** (**117**) ist hingegen einfach Isopropyl geschützt. Mit den durchgeführten Untersuchungen sollte überprüft werden, ob der *Prodrug*-Ansatz zu einer Verbesserung der *in vivo* Aktivität führt und inwiefern die Schutzgruppen die Aktivität am isolierten Enzym beeinträchtigen unter der Annahme, dass ein Zellimport erfolgt, jedoch keine Freisetzung der aktiven Verbindung stattfindet.

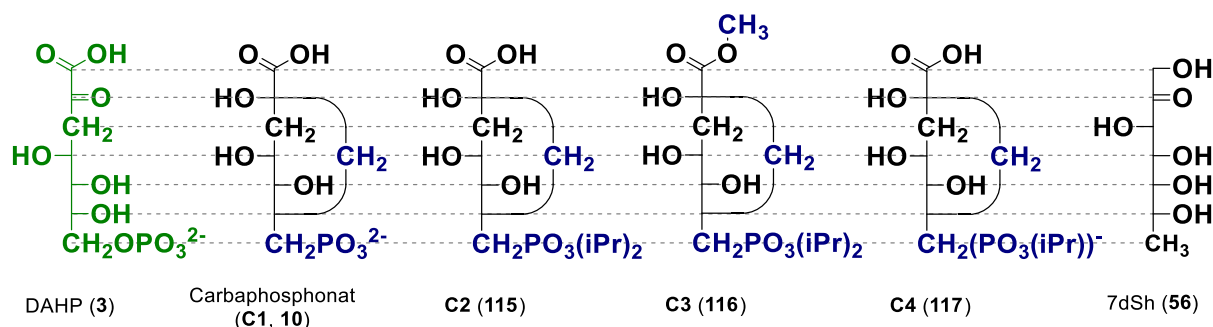


Abbildung 36: Übersicht aller für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Carbaphosphonate. Als Vergleichsverbindungen sind DAHP (**3**) in Grün und 7dSh (**56**) in Schwarz dargestellt. Blau hervorgehoben sind für die Carbaphosphonate alle strukturellen Unterschiede im Vergleich zu DAHP (**3**).

Die biologischen Untersuchungen wurden im Rahmen von Kooperationsprojekten mit JOHANNA RAPP („Glykobiotechnologie“, Arbeitsgruppe FORCHHAMMER), ÜNER KOLUKISA OGLU (Arbeitsgruppe HARTER, Universität Tübingen) und MARVIN BRAUN (Arbeitsgruppe HARTER) durchgeführt.

Folgende Experimente waren Teil der biologischen Arbeiten:

- *In vivo* Inhibierungsstudie am Cyanobakterium *A. variabilis*
- Bestimmung der Zelldichte behandelter *A. variabilis* Zellen über den Chlorophyll *a* Gehalt
- Absorptionsstudie zur Aufnahme der Inhibitoren in die Zellen von *A. variabilis*
- Akkumulation von DAHP (**3**), als biologisches Substrat der DHQS, in mit Inhibitor behandelten *A. variabilis* Zellen
- Bestimmung der inhibitorischen *in vitro* Aktivität der Verbindungen über den IC₅₀-Wert an der isolierten DHQS von *A. thaliana*
- *In vivo* Inhibierungsstudie an der Modellpflanze *A. thaliana*
- Intrazelluläre Akkumulation von 7dSh (**56**) und 7d7FSh (**63**) in *A. thaliana*

RAPP führte die *in vivo* Experimente an *A. variabilis*, sowie das *in vitro* Experiment an *A. thaliana* durch. MARVIN BRAUN führte das Experiment zur Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von 7dSh (**56**) und 7d7FSh (**63**) in *A. thaliana* durch. Eine genauere Auflistung der gemeinschaftlichen Arbeiten ist in Kapitel 6 aufgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen sind im Laufe mehrerer Jahre entstanden. Aufgrund dessen und aufgrund geringer Substanzmengen, konnten nicht alle aufgeführten biologischen Untersuchungen an allen Verbindungen durchgeführt werden. Eine Übersicht hierzu ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Übersicht der durchgeführten biologischen Untersuchungen der Desoxyheptulosen **56**, **63** – **69**, sowie der Carbaphosphate **C1** – **C4**.

Verbindung	<i>In vivo</i> Inhibierung <i>A. variabilis</i>	Chlorophyll <i>a</i> Gehalt <i>A. variabilis</i>	Absorptions- studie <i>A. variabilis</i>	DAHP (3) Akkumulation <i>A. variabilis</i>	IC ₅₀ -Wert <i>A. thaliana</i>	<i>In vivo</i> Inhibierung <i>A. thaliana</i>
7dSh (56)	X	X	X	X	X	X
7d7FSh (63)	X	X	X	X	X	X
5,7dd5Flh (64)	X	X	X	X	X	X
7d5MSh (65)	X	X	X	X	X	X
7dGh (66)	X	X	X	X	X	X
5,7ddGh (67)					X	X
COOH-7dSh (68)						X
Perac-7dSh (69)	X					X
C1 (10)	X	X	X	X	X	X
C2 (115)	X	X			X	
C3 (116)	X	X			X	
C4 (117)	X	X			X	

4.1 *In vivo* Untersuchungen am Cyanobakterium *A. variabilis*

In der Entwicklung neuer Herbizide werden erste Untersuchungen mit einfach kultivierbaren phototrophen Organismen in Flüssigkultur durchgeführt, z.B. *Scenedesmus acutus* (Grünalge), *Lemna paucicostata* (Wasserlinse, Pflanze), *Gallium mologu* (Wiesen-Labkraut, Pflanze).^[102-103] BRILISAUER *et al.* etablierten die Gehaltsbestimmung von 7dSh (**56**) in Kulturüberständen unterschiedlichster Cyanobakterien durch einen bioaktivitätsgesteuerten Assay in Flüssigkultur unter Verwendung des 7dSh-sensitiven filamentösen Cyanobakteriums *Anabaena variabilis*.^[66] Dieser Assay ermöglichte die Analyse der *in vivo* Aktivität der synthetisierten Derivate. Die verwendeten *A. variabilis* Kulturen wurden in 24-well Platten in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen (0, 5, 10, 50, 100, 250 µM) des jeweiligen Inhibitors für 4 Tage kultiviert (Abb. 37A). Nach diesen 4 Tagen konnte ausschließlich für die Verbindungen 7dSh (**56**) und 7d7FSh (**63**) eine Aktivität festgestellt werden. Im Falle von 7dSh (**56**) war bei der niedrigsten eingesetzten InhibitorKonzentration von 5 µM visuell noch eine Aktivität nachweisbar. Im Falle von 7d7FSh (**63**) konnte bei 100 µM visuell noch eine Aktivität festgestellt werden. Bei Perac-7dSh (**69**) konnte bis zu einer Konzentration von 26 µM, eine Aktivität nachgewiesen werden. Die Konzentration unterscheidet sich im Vergleich zu den Konzentrationen in Abbildung 37A da diese Untersuchung zu einem früheren Zeitpunkt stattfand. Die Aktivität ist nicht in Abbildung 37A dargestellt, da festgestellt wurde, dass die Verbindung unter den Wachstumsbedingungen von *A. variabilis* nicht stabil war. RAPP inkubierte hierzu Perac-7dSh (**69**) in wässrigen Lösungen

verschiedener pH-Werte (pH 3, 7, 9). Die Lösungen wurden anschließend mittels LC-HRMS analysiert. Ein pH-Wert von 9, welcher den Wachstumsbedingungen von *A. variabilis* entspricht, führte zu einer Verseifung der Acetylerster und somit zu einer Freisetzung von 7dSh (**56**). Ebenso konnte im Kulturmedium, in mit Perac-7dSh (**69**) behandelte Kulturen, 7dSh (**56**) nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde Perac-7dSh (**69**) für keine weiteren cyanobakteriellen Untersuchungen herangezogen. Alle anderen Test-Verbindungen zeigten keine *in vivo* Aktivität gegen *A. variabilis*.

Um die hier erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Zelldichte über den Gehalt an Chlorophyll *a* bestimmt. Dazu wurden die *A. variabilis* Zellen für 4 Tage in Anwesenheit von 250 μM des jeweiligen Inhibitors kultiviert und anschließend untersucht (Abb. 37B). In Übereinstimmung mit den visuellen Effekten auf das Wachstum konnte nur für die beiden Verbindungen 7dSh (**56**) und 7d7FSh (**63**) eine signifikant reduzierte Zelldichte festgestellt werden. 7dSh (**56**) zeigte dabei einen stärkeren Einfluss als 7d7FSh (**63**). Alle anderen Test-Verbindungen zeigten erneut keine Aktivität und somit keine reduzierte Zelldichte gegen *A. variabilis*.

Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen decken sich im Falle des Carbaphosphonates C1 (**10**) mit der Literatur, in welcher ebenfalls keine *in vivo* Aktivität festgestellt werden konnte.^[18] Die derivatisierten Prodrug-Carbaphosphonate C2 (**115**), C3 (**116**) und C4 (**117**) erbrachte ebenfalls keine *in vivo* Aktivität an *A. variabilis*.

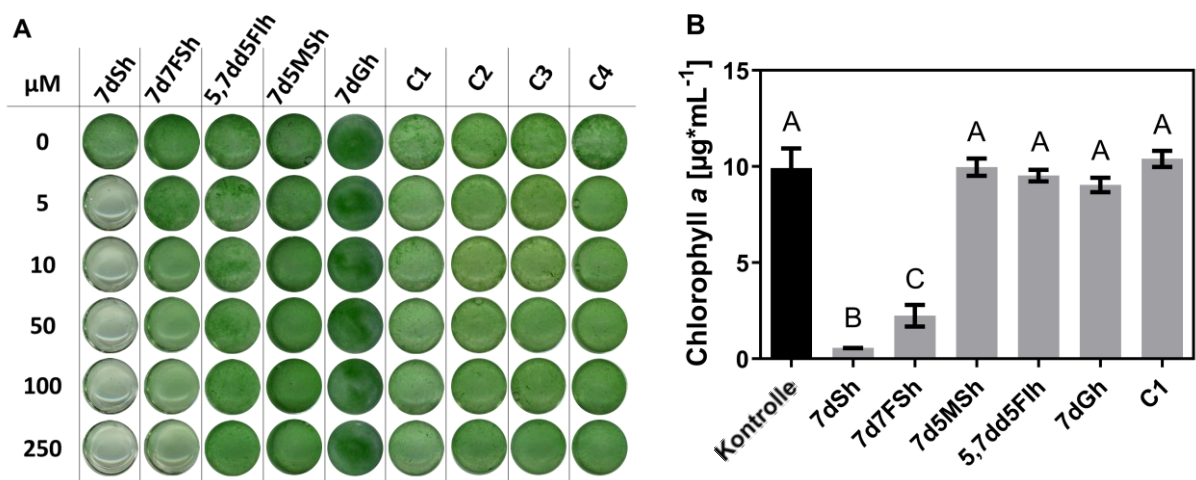


Abbildung 37: Einfluss der verschiedenen Verbindungen auf das Wachstum von *A. variabilis*. A) *A. variabilis* wurde für 4 Tage in BG11-Medium mit der jeweiligen Verbindung in verschiedenen Konzentration kultiviert. Die Verbindungen wurden den Kulturen bei einer optischen Dichte von $\text{OD}_{750} = 0,05$ zugegeben. B) Zelldichte (abgebildet über die Menge an Chlorophyll *a*) von *A. variabilis* bei einer Behandlung mit 250 μM der angegebenen Verbindung. Die Verbindungen wurden den Kulturen bei einem Chlorophyll *a* Gehalt von 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\text{OD}_{750} = 0,05$) zugegeben und für 4 Tage kultiviert. Die Daten bilden den Mittelwert und die Standardabweichung von je drei unabhängigen Replikaten ab. Mittelwerte mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p\text{-Wert} < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Eine fehlende *in vivo* Aktivität potentieller DHQS Inhibitoren ist beispielsweise auf einen fehlenden aktiven oder auch inaktiven Zellimport zurückzuführen.^[104] RAPP *et al.* untersuchten in diesem Zusammenhang eine Vielzahl an cyanobakteriellen Stämmen und stellten fest, dass die Sensitivität gegenüber 7dSh (**56**) teilweise mit der Fähigkeit des heterotrophen Wachstums, also mit der Möglichkeit der Aufnahme von Zuckern, korreliert. Somit wurde die Hypothese verfasst, dass der Import von 7dSh (**56**) durch promiskuitive Transporter stattfindet. Im Falle von *A. variabilis* konnte nachgewiesen werden, dass 7dSh (**56**) über den Fructose-ABC-Transporter aufgenommen wird. Eine spontane Mutation des Fructose-ABC-Transporter von *A. variabilis* aus einer Experimentreihe, bei sublethalen Konzentrationen an 7dSh (**56**) bestätigte dies, da die Mutante keine Sensitivität mehr gegenüber dem Inhibitor besaß. Das Klonen dieses Transporters in das zuvor resistente Cyanobakterium *Anabaena sp.* über ein Plasmid, welches das Operon des Transporters besaß, führte zudem zur Bildung einer sensitiven Mutante. Im Falle von *Synechocystis sp.* PCC 6803 wurde 7dSh (**56**) hingegen zum Großteil über den Glucose-Permease-Transporter aufgenommen. Dies wurde ebenfalls durch eine spontane Mutante bestätigt, welche keine Glucose (**118**) mehr als Kohlenstoffquelle nutzen konnte und gleichzeitig eine starke Reduktion der Sensitivität gegenüber 7dSh (**56**) aufwies. Neben Glucose (**118**) kann dieser Transporter auch 3-*O*-Methyl-glucose (**119**) und Fructose (**120**) transportieren (Abb. 38).^[93]

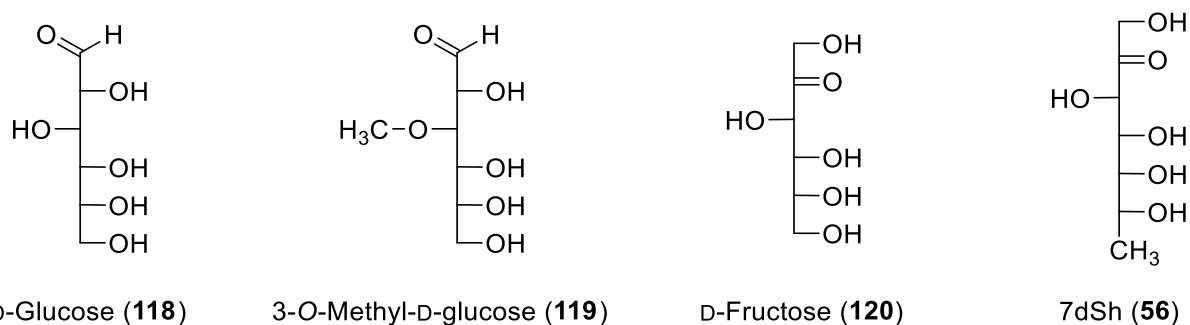


Abbildung 38: Chemische Strukturen der Monosaccharide welche über den Glucose-Permease-Transporter von *Synechocystis sp.* PCC 6803 aufgenommen werden können. Sowie 7dSh (**56**) als struktureller Vergleich.

Aufgrund dieses Sachverhaltes wurde in einem weiteren Experiment die Aufnahme der Verbindungen in die Zellen untersucht. Hierfür wurden 250 µM der zu testenden Verbindungen bei einem Chlorophyll *a* Gehalt von 6,25 µg/mL (OD₇₅₀ = 0,5) in das Kulturmedium von *A. variabilis* gegeben und anschließend zu definierten Zeitpunkten (8 h, 24 h und 48 h) Proben entnommen, um die noch vorhandenen Substanzmengen mittels LC-HRMS zu bestimmen. Da lediglich die Abnahme der Substanzmengen im Kulturmedium bestimmt wurde, jedoch keine Gehalte in den Zellen, konnte eine mögliche Adsorption oder Zersetzung der Verbindungen nicht ausgeschlossen werden. Abbildung 39A zeigt die

prozentuale Abnahme der Gehalte im Kulturmedium zu den jeweiligen Zeitpunkten, bezogen auf die ursprünglich zugegebene Substanzmenge. Nach 48 h konnten im Falle von 7dSh (**56**) nur noch etwa 50 % der ursprünglich zugegebenen Menge im Kulturüberstand nachgewiesen werden. 5,7dd5FIh (**64**) zeigte nach 24 h eine ähnliche Abnahme im Kulturüberstand und nach 48 h konnte sogar ein geringerer Gehalt im Vergleich zu 7dSh (**56**) festgestellt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf, dass die Verbindung höchstwahrscheinlich in die Zellen aufgenommen wird, jedoch keine inhibitorische Aktivität besitzt (vgl. Abb. 37). 7d5MSh (**65**) und C1 (**10**) zeigten keine Abnahme der Substanzmenge im Kulturmedium. Für C1 (**10**) deckt sich der fehlende Import erneut mit der Literatur.^[18] Im Falle von 7d5MSh (**65**) könnte die zusätzliche Methoxygruppe an C-5 einen aktiven Transporter verhindern. 7dGh (**66**) zeigte eine geringe Abnahme im Kulturüberstand. Als überaus interessant erwies sich die Reduktion der Substanzmenge von 7d7FSh (**63**). Hier konnte nach 24 h keinerlei Verbindung mehr im Kulturüberstand festgestellt werden. Die bessere Aufnahme steht im Widerspruch zur geringeren *in vivo* Aktivität im Vergleich zu 7dSh (**56**).

Um einen tieferen Einblick in die *in vivo* Aktivität und den Mode of Action (MoA) zu erhalten, wurde die DAHP-Akkumulation in behandelte Zellen untersucht (Abb. 39B). Hierfür wurde die Zellen 5 h mit 250 μM der jeweils angegebenen Verbindung behandelt (Zugabe Zeitpunkt: $\text{OD}_{750} = 0,5$). Die DAHP Akkumulation wurde anschließend mittels LC-HRMS über die Peakflächen der $[\text{M}+\text{H}]^+$ und $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Ionen von DAHP (**3**) bestimmt. Aus vorherigen Studien von BRILISAUER *et al.* konnte eine schnelle und starke Akkumulation von DAHP (**3**), in 7dSh behandelten Zellen, nachgewiesen werden.^[66] Die Untersuchungen der synthetisierten Derivate im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass Zellen die mit den Verbindungen 5,7dd5FIh (**64**), 7dGh (**66**) und C1 (**10**) behandelt wurden, genauso wie unbehandelte Zellen, nur eine sehr geringe Menge an DAHP (**3**) aufwiesen. Im Falle von 7d5MSh (**65**) konnte sogar kein DAHP (**3**) nachgewiesen werden. Die Verbindung 7d7FSh (**63**) zeigte hingegen eine signifikant höhere Akkumulation von DAHP (**3**), im Vergleich zu 7dSh (**56**). Diese höhere Akkumulation steht erneut im Widerspruch zur geringeren *in vivo* Aktivität, im Vergleich zu 7dSh (**56**).

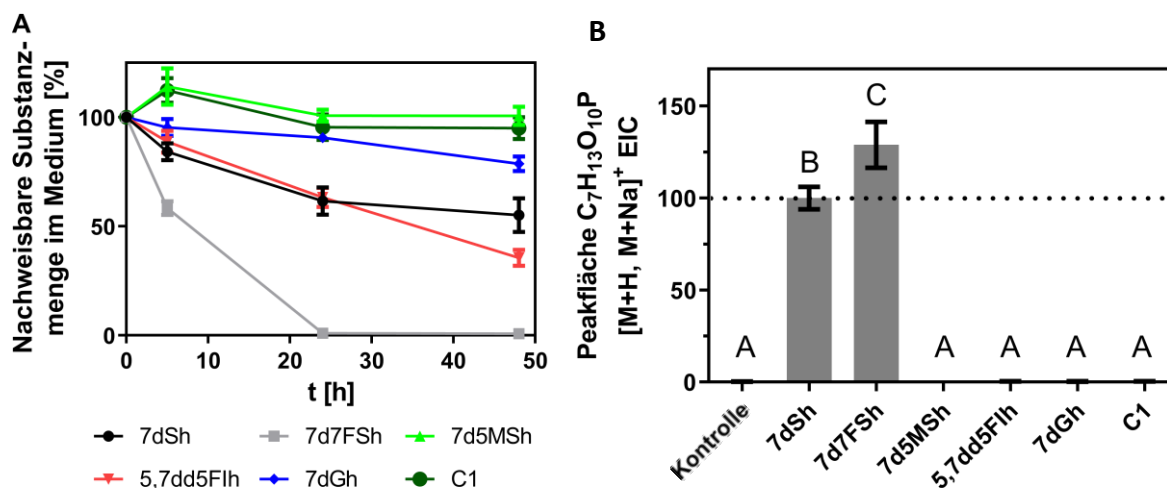


Abbildung 39: Effekte verschiedener Verbindungen auf *A. variabilis*. A) Prozentuale Abnahme der jeweiligen Verbindung im Kulturüberstand von *A. variabilis*. Die Daten bilden den Mittelwert und die Standardabweichung von je drei unabhängigen Replikaten ab. B) Akkumulation von DAHP (3) in *A. variabilis* Zellen, behandelt mit 250 μM der jeweils angegebenen Verbindung. Relative Quantifizierung wurde prozentual zur nachgewiesenen Menge an DAHP (3) in mit 7dSh (56) behandelten Zellen abgebildet. Die Daten bilden den Mittelwert und die Standardabweichung von je drei unabhängigen Replikaten ab. Mittelwerte mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p\text{-Wert} < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.2 Biologische Untersuchungen an der Modellpflanze *A. thaliana*

4.2.1 *In vitro* Untersuchungen an *A. thaliana*

Aufgrund der herbiziden Aktivität von 7dSh (56)^[66] sollte im Hinblick auf einen möglichen zukünftigen Einsatz als Herbizid das inhibitorische Potential der 7dSh- und Carbaphosphonat-Derivate, erstmals an der isolierten DHQS aus der Pflanze *A. thaliana* (*At*DHQS), bestimmt werden. Dazu wurde das DHQS-Gen aus *A. thaliana* in einen *Escherichia coli* (*E. coli*) Expressionsvektor kloniert, anschließend in *E. coli* exprimiert und über eine His-Tag Affinitätschromatographie aufgereinigt. Vor der Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten der 7dSh- und Carbaphosphonat-Derivate wurden die kinetischen Parameter der nativen Reaktion von DAHP (3) zu DHQ (4) bestimmt. Hierbei konnte k_M mit $2,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ und v_{max} mit $170,4 \pm 6,1 \mu\text{M}$ bestimmt werden. k_M ist die Michaeliskonstante, welche die Substratkonzentration angibt, bei welcher die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist und v_{max} beschreibt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ($v = \frac{1}{2} * v_{\text{max}}$). Diese Werte entsprechen literaturbekannten Bestimmungen an *Actinidia chinensis* (Pflanze, k_M 1,3 μM) oder *Aspergillus nidulans* (Pilz, k_M 9,3 μM).^[105] Anschließend wurden die IC_{50} -Werte an der *At*DHQS bestimmt (Tab. 4).

Der Zusammenhang zwischen K_i - und IC_{50} -Wert kann, sofern es sich um einen kompetitiven Inhibitor handelt, über die Cheng-Prusoff-Gleichung gezeigt werden: $IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right)$. Hierbei entspricht $[S]$ der Konzentration des Substrates bei der Bestimmung des IC_{50} -Wertes.^[17] Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Substratkonzentration von 2,5 μ M DAHP (**3**) verwendet.^[106] Abbildung 40 zeigt die relative Aktivität (Aktivität bei einer bestimmten Inhibitor-Konzentration / Aktivität ohne Inhibitor) aufgetragen gegen die Inhibitor-Konzentration. Der IC_{50} -Wert kann anschließend über die folgende Formel bestimmt werden: $Y = \text{Minimum} + \frac{(\text{Maximum} - \text{Minimum})}{1 + \frac{x}{IC_{50}}}$. Als Vergleich für einen cyanobakteriellen Inhibierungswert wurde der IC_{50} -Wert von 7dSh (**56**) gegen die DHQS von *A. variabilis* (Cyanobakterium, AvDHQS) bestimmt. Im untersuchten Konzentrationsbereich bis 1000 μ M besitzen ausschließlich 7d5MSh (**65**) und Sedoheptulose (**23**) keine inhibitorische Aktivität gegenüber der DHQS aus *A. thaliana*. Alle weiteren 7dSh- und Carbaphosphonat-Analoga sind Inhibitoren der AtDHQS, wobei sich die Aktivitäten vom hohen mikromolaren bis niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich erstrecken. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde in zwei Messserien, deklariert als [a] und [b], durchgeführt. Zwischen diesen beiden Untersuchungen lagen mehrere Monate, daher wurde für jede Serie neue AtDHQS exprimiert und aufgereinigt. Durch die Trennung in Serien sind zulässige Schwankungen aufgetreten, welche in der Interpretation der Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR) berücksichtigt werden müssen.

Tabelle 4: IC_{50} -Werte der DHQS-Inhibitoren. ^[a], ^[b] Werte verschiedener Messserien mit jeweils frisch aufgereinigter AtDHQS. ∞ : keine Inhibierung im gemessenen Konzentrationsbereich bis 1000 μ M festgestellt.

DHQS isoliert aus	Inhibitor	IC_{50} [μ M]
<i>Anabaena variabilis</i>		
AvDHQS	7dSh (56)	23,3 ^[a]
<i>Arabidopsis thaliana</i>		
AtDHQS	7dSh (56)	143,5 ^[a] / 85,5 ^[b]
AtDHQS	7d7FSh (63)	200,4 ^[a]
AtDHQS	5,7dd5FIh (64)	250,1 ^[a]
AtDHQS	7d5MSh (65)	∞ ^[a]
AtDHQS	7dGh (66)	464,7 ^[a]
AtDHQS	Sedoheptulose (23)	∞ ^[a]
AtDHQS	Carbaphosphonat C1 (10)	$0,5 \times 10^{-3}$ ^[a]
AtDHQS	C2 (115)	929,8 ^[a]
AtDHQS	C3 (116)	147,6 ^[a]
AtDHQS	C4 (117)	$0,6 \times 10^{-3}$ ^[a]
AtDHQS	5,7ddGh (67)	118,3 ^[b]

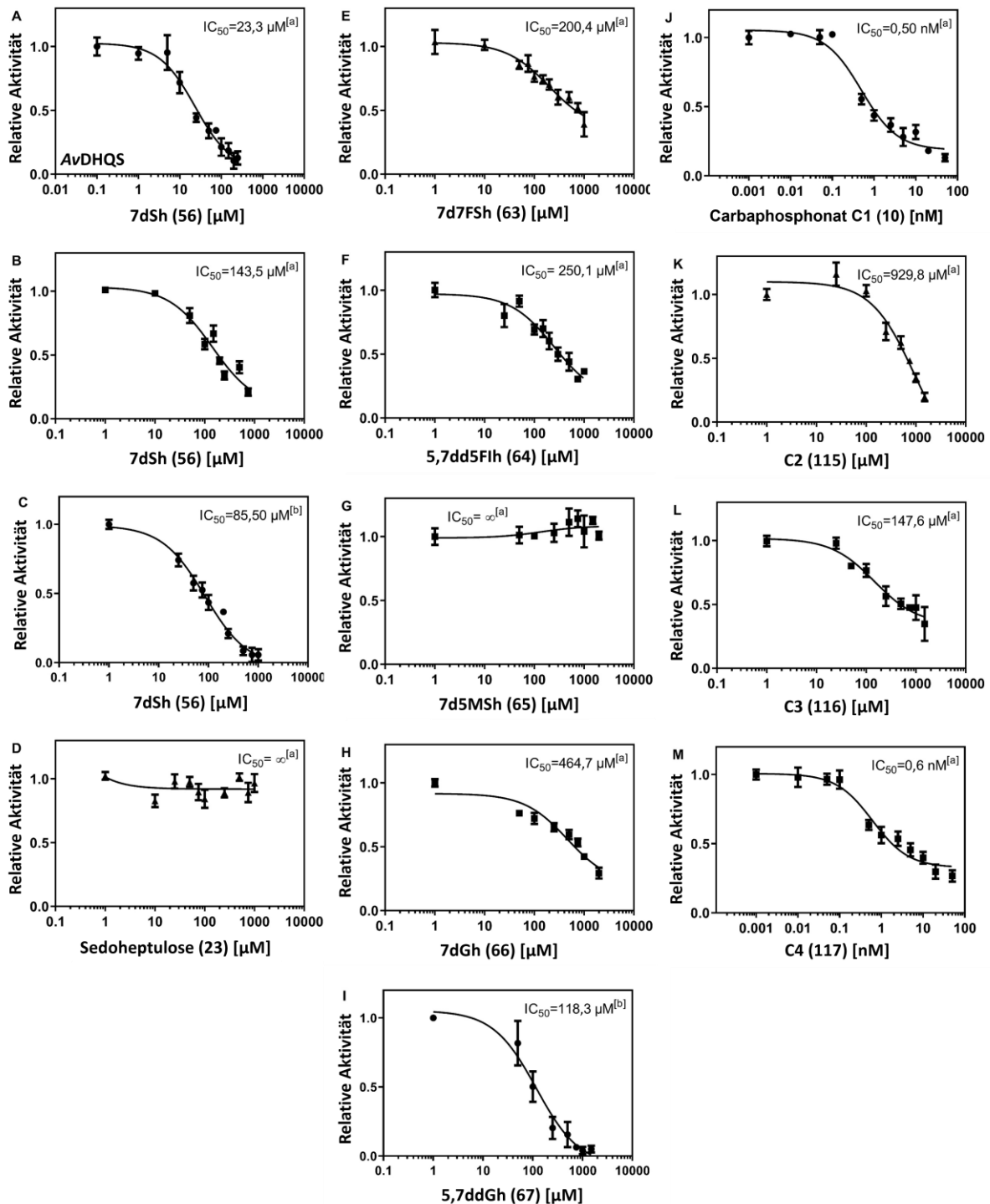


Abbildung 40: Inhibierung der DHQS vermittelten Reaktion von DAHP (3) zu DHQ (4) durch verschiedene Verbindungen, dargestellt als relative Aktivität gegen die Inhibitor-Konzentration. ^[a], ^[b] Werte verschiedener Messserien mit jeweils frisch aufgereinigter *At*DHQS. A) Inhibierung der *Av*DHQS durch 7dSh (56). B) – C) Inhibierung der *At*DHQS durch 7dSh (56) in zwei verschiedenen Messserien. D) Inhibierung der *At*DHQS durch Sedoheptulose (23). E) – I) Inhibierung der *At*DHQS durch 7dSh-Derivate. J) – M) Inhibierung der *At*DHQS durch Carbaphosphonate. Die Daten bilden den Mittelwert und die Standardabweichung von je 3-4 unabhängigen Replikaten ab.

Eine SAR-Analyse der erhaltenen IC₅₀-Werte wird, unter Zuhilfenahme des literaturbekannten Reaktionsmechanismus der DHQS, durchgeführt. Um eine Hypothese zur Abhängigkeit von Struktur und Wirkung aufzustellen muss der erste Schritt der DHQS-Katalyse mit allen polaren Wechselwirkungen, welche für eine Stabilisierung der Verbindung im aktiven Zentrum verantwortlich sein können, betrachtet werden (Abb. 41).

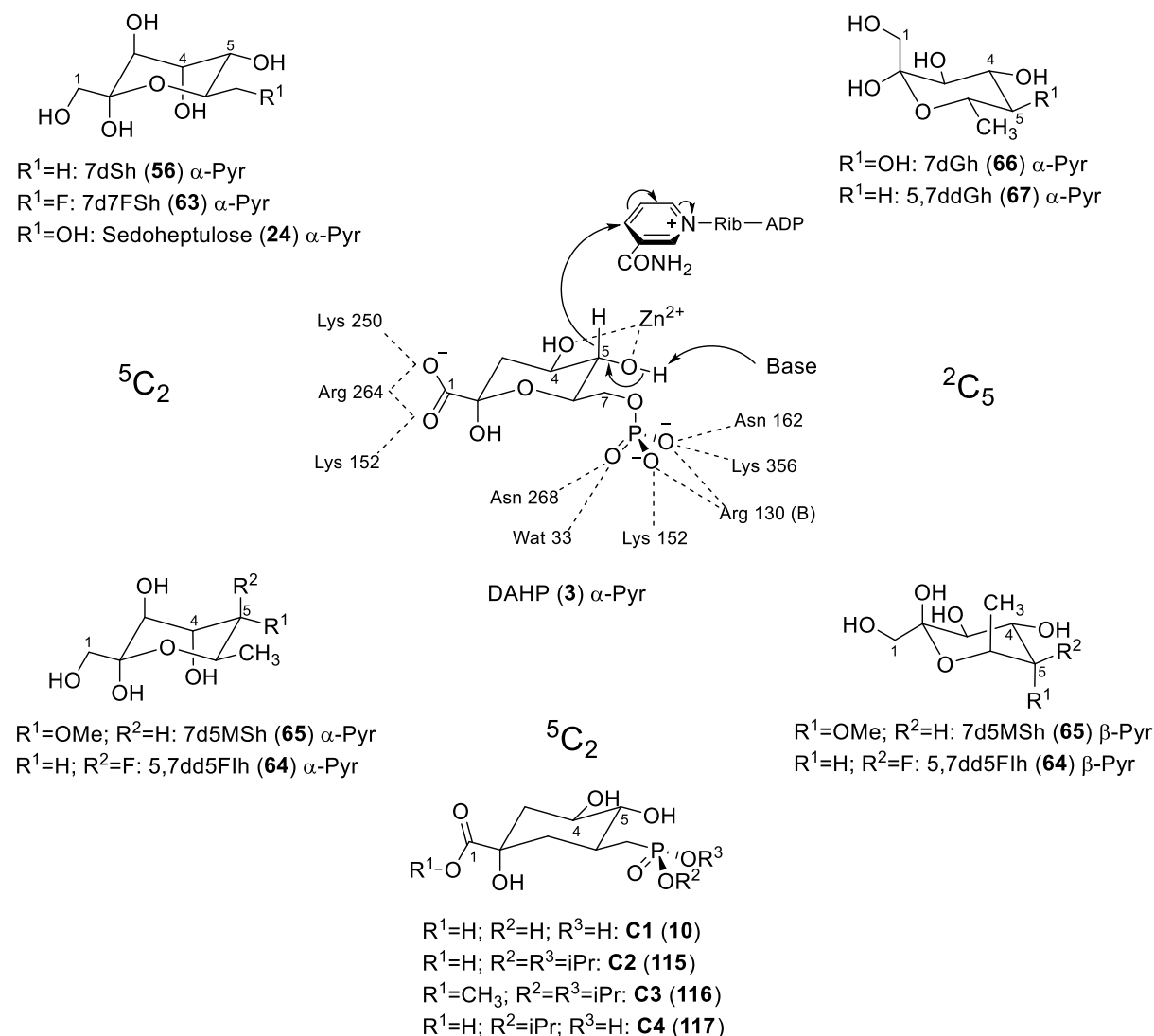


Abbildung 41: Erster Reaktionsschritt der DHQS-Katalyse von DAHP (**3**) zu DHQ (**4**), mit allen polaren Wechselwirkungen zur Stabilisierung der Verbindung im aktiven Zentrum. Aminosäure-Nummern stammen von der DHQS von *Aspergillus nidulans* (Pilz). Darum angeordnet sind als Vergleich alle Verbindungen, für die ein IC₅₀-Wert bestimmt wurde.

Um den ersten Reaktionsschritt angeordnet sind die Verbindungen, für die ein IC₅₀-Wert bestimmt wurde (vgl. Tab. 4). Sie sind in die in Kapitel 3.4 bestimmten Pyranose-Konformationen, mit ihren jeweiligen Anomeren, gruppiert. Die Nummern der Aminosäuren stehen für die Position im Proteinanteil der DHQS, hier beispielhaft für die DHQS von *Aspergillus nidulans* (Pilz).^[13] Alle hier abgebildeten Aminosäuren sind üblicherweise auch in

den DHQS-Enzymen anderer Spezies, mit geringfügig abweichenden Positionsnummern vorhanden. Hierzu zählen unter anderem: *Aspergillus nidulans* (Pilz), *Staphylococcus aureus* (Bakterium), *Thermus thermophilus* (Bakterium), *Helicobacter pylori* (Bakterium).^[8, 22, 24] Für *A. variabilis* und *A. thaliana* sind keine Kristallstrukturen ihrer DHQS-Enzyme in der PROTEIN DATA BANK vorhanden.

Die nanomolare Aktivität des Carbaphosphonates **C1 (10)** mit 0,5 μM stimmt mit literaturbekannten Aktivitäten an DHQS-Enzymen anderer biologischer Quellen überein.^[14, 21, 107-108] Die hohe Aktivität ergründet sich im Austausch der Phosphatgruppe durch eine Phosphonatgruppe, sowie dem Austausch des Pyranosylring-Sauerstoffs durch ein Kohlenstoffatom (vgl. Kapitel 1.3). Dies führt laut BENDER *et al.* zu einer Änderung des Redoxpotentials an C-5, weshalb der erste Schritt der DHQS, die Oxidation der sekundären Hydroxylgruppe an C-5 zum Keton, erleichtert ist. Der nächste Schritt der DHQS, die β -Eliminierung des Phosphats, kann weiterhin nicht stattfinden, was wiederum zur Inhibierung der Reaktion führt. Auf dieser Grundlage postulierte BENDER *et al.* 1989, dass die Hydroxylgruppe an C-5 essenziell für einen stark bindenden Inhibitor ist, da das gebildete 5-Keto-Intermediat **121** sowie das daraus entstehende NADH sehr fest im aktiven Zentrum binden sollen (Abb. 42).^[14] Jedoch konnte MONTCHAMP *et al.* 1992 dieses Postulat, durch die *in vitro* Analyse der synthetisierten Verbindungen 4-Desoxy- und 5-Desoxy-Carbaphosphonat (**122**, **123**), entkräften. Für beide Verbindungen konnte ein nahezu identischer Aktivitätsverlust von etwa zwei Potenzen festgestellt werden. Dennoch sind beide Verbindungen respektable Inhibitoren (4-Desoxy-Carbaphosphonat (**122**) $K_i: 2,2 \times 10^{-7}$ M; 5-Desoxy-Carbaphosphonat (**123**) $K_i: 5,4 \times 10^{-7}$ M).^[107] Dies steht im Widerspruch zur Hypothese von BENDER *et al.*, da das 5-Desoxy-Derivat keine Hydroxylgruppe an C-5 besitzt und somit keine Oxidation stattfinden kann. Da des Weiteren bei der DHQS-Reaktion die C-4 Hydroxylgruppe nicht am ersten Schritt aktiv beteiligt ist und das 4-Desoxy-Derivat zudem zum 4-Desoxy-5-Keto-Intermediat **124** reagieren kann, hätte das 4-Desoxy-Derivat einen merklich geringeren Aktivitätsverlust besitzen sollen.^[107] Die gemessenen Aktivitätsverluste könnten somit lediglich auf die fehlenden Zn^{2+} -Hydroxyl-Wechselwirkungen zurückgeführt werden (Abb. 42). Die Entkräftigung des Postulates von BENDER *et al.* ist essenziell für die hier synthetisierten 7dSh-Derivate aus Synthesestrategie B (s. Kapitel 3.2), da die Stabilisierung der Pyranose-Form durch die Derivatisierung der Hydroxylgruppe an C-5 vorgenommen wurde.

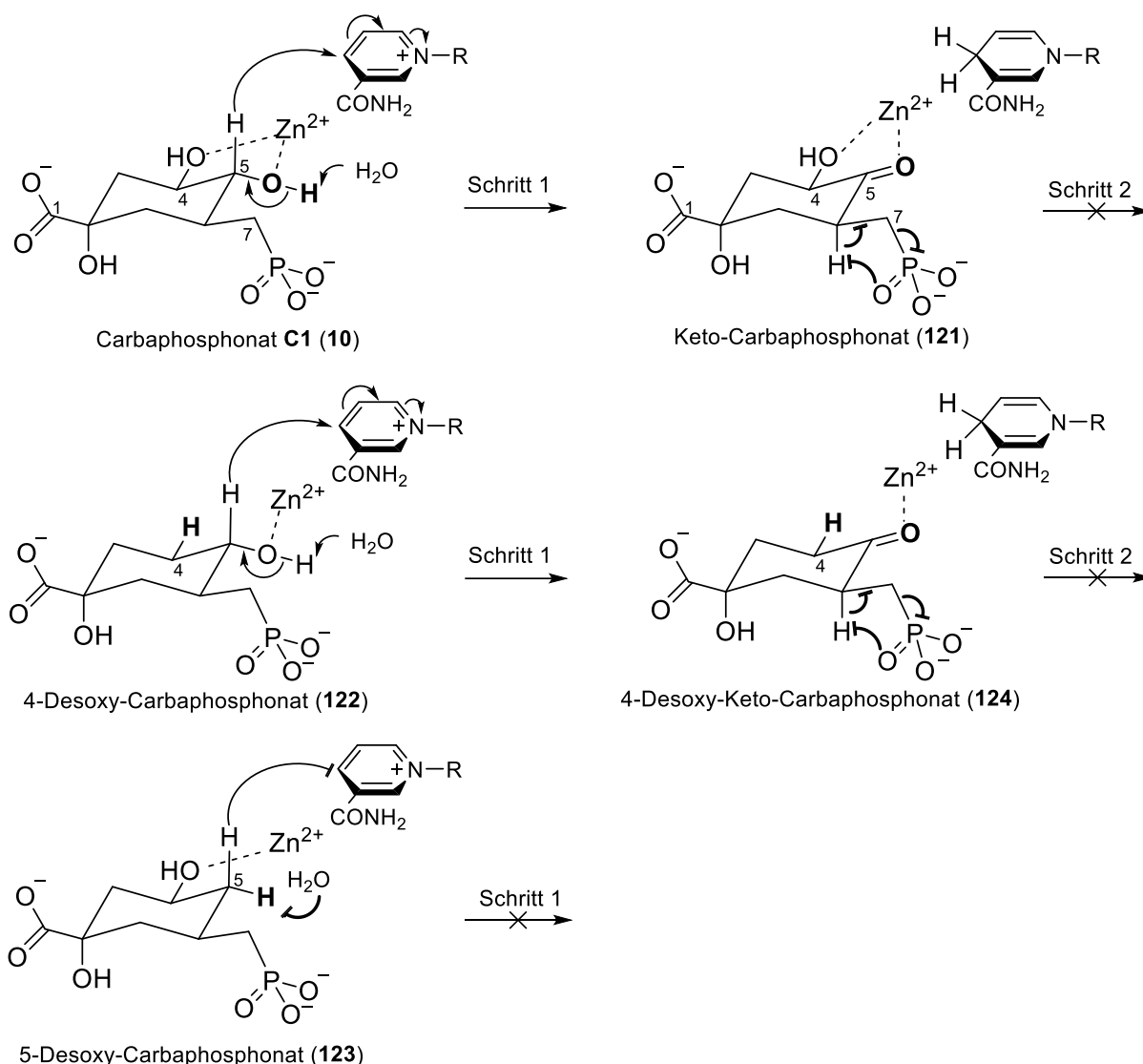


Abbildung 42: Vergleich der Verbindungen **C1 (10)**, 4-Desoxy- und 5-Desoxy-Carbaphosphonat (**122**, **123**) in der Inhibition der DHQS.^[107] Im Falle von **C1 (10)** und 4-Desoxy-Carbaphosphonat (**122**) kann der erste Schritt der enzymatischen DHQS Reaktion ablaufen, was zum Keto-Intermediat (**121**, **124**) führt. Die anschließende Eliminierung von anorganischem Phosphat ist aufgrund der Phosphonat-Gruppe nicht möglich. Eine Oxidation der Verbindung 5-Desoxy-Carbaphosphonat (**123**) an C-5 ist aufgrund der Desoxy-Funktion nicht möglich, weshalb der erste Schritt initial nicht stattfinden kann.

Ein Vergleich der möglichen Wechselwirkungen von DAHP (**3**), als natürliches Substrat und Carbaphosphonat **C1 (10)** bestätigt die guten Inhibitoreigenschaften, da alle polaren Wechselwirkungen, die im Falle von DAHP (**3**) eingegangen werden, auch für **C1 (10)** möglich sind (Abb. 41). Bei den Carbaphosphonaten **C2 (115)**, **C3 (116)** und **C4 (117)** handelt es sich um *Prodrug*-Derivate (s. Kapitel 4). Nach Überwindung der biologischen Barriere sollte bei diesen Verbindungen die Freisetzung der aktiven Spezies stattfinden. Diese Freisetzung ist jedoch nicht gewährleistet, weshalb ebenso diese *Prodrug*-Derivate auf ihre Aktivität am isolierten Enzym getestet wurden. Carbaphosphonat **C2 (115)** zeigte in dem durchgeführten Aktivitätstest einen IC₅₀-Wert von 929,8 µM was im Vergleich zu **C1 (10)**; 0,5 x 10⁻³ µM) einem starken Aktivitätsverlust entspricht (Abb. 43). Möglicherweise führen

die beiden raumeinnehmenden Isopropyl-Reste an der Phosphonatgruppe zu sterischen Hinderungen am Enzym und/oder unterbinden die möglichen polaren Wechselwirkungen der Phosphonatgruppe. Zudem wird die Zahl potenziell negativer Ladungen im Vergleich zu **C1 (10)** reduziert. TIAN *et al.* postulierten, dass Carbaphosphonate mit der Möglichkeit zur Ausbildung einer dreifach negativen Ionisierung bessere Inhibitoren darstellen.^[104] Dies wäre im Falle von **C2 (115)** nicht gegeben und erklärt somit den Aktivitätsverlust. Für Carbaphosphonat **C3 (116)**, mit seiner Diisopropylveresterung an der Phosphonatgruppe und der Methylveresterung an der Carbonsäure, wurde ein IC₅₀-Wert von 147,6 μM bestimmt und ist somit deutlich aktiver als **C2 (115, Abb. 43)**. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Hypothese von TIAN *et al.*, da **C3 (116)** aufgrund der Veresterungen keine negativen Ladungen ausbilden kann. Wiederum konnte vor dieser Forschungsarbeit und der hieraus entstandenen Veröffentlichung, keine Literatur zur biologischen Untersuchung von Carbaphosphonaten mit veresteter Carboxylgruppe gefunden werden.^[106] Eine vorzeitige Entschützung der *Prodrugs* wurde durch LC-HRMS-Analyse vor den Aktivitätsuntersuchungen ausgeschlossen. Inwiefern die *Prodrug*-Derivate im Tris-HCl-Puffersystem bei pH 7,5 während der Messung stabil sind, wurde nicht untersucht. Carbaphosphonat **C4 (117)** zeigte einen IC₅₀-Wert von 0,6 nM (0,6 x 10⁻³ μM) und besitzt einen Isopropyl-Rest. Somit ist die Zahl voluminöser funktioneller Gruppen reduziert und die Anzahl möglicher negativer Ladungen erhöht, was zu einer verbesserten Aktivität im Vergleich zu **C2 (115)** und **C3 (116)** führt (Abb. 43). Im Vergleich zu **C1 (10)** ist die Aktivität von **C4 (117)** nur minimal geringer, was dafür spricht, dass trotz der Isopropyl-Gruppe die meisten polaren Wechselwirkungen ausgebildet werden können.

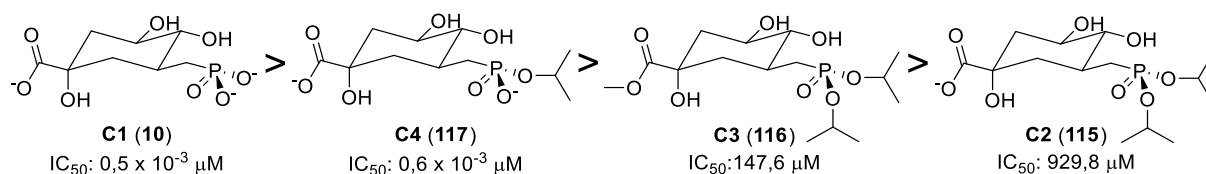


Abbildung 43: Aktivitätsvergleich der vier untersuchten Carbaphosphonate **C1 – C4** mit Strukturformel und Aktivität in μM.

7dSh (**56**) als Basisstruktur besitzt einen IC₅₀-Wert von 85,5 – 143,5 μM gegen die DHQS von *A. thaliana* und einen IC₅₀-Wert von 23,3 μM gegen die AvDHQS. Somit inhibiert 7dSh (**56**) beide Enzyme in einem ähnlichen Aktivitätsbereich. Der Fokus im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch auf die herbizide Aktivität gelegt, die später diskutiert wird. Ein direkter Vergleich der *in vitro* Aktivitäten zwischen 7dSh (**56**) und den Carbaphosphonaten ist, aufgrund des literaturbekannten Fehlens der *in vivo* Aktivitäten der Carbaphosphonate, nur

bedingt sinnvoll. Dennoch könnte der große *in vitro* Aktivitätsunterschied von 7dSh (**56**) im Vergleich zu **C1** (**10**) zum einen dem Fehlen negativer funktioneller Gruppen, und zum anderen dem geringen Anteil von lediglich etwa 20 % Pyranose-Form zugeschrieben werden. Weitere strukturelle Unterschiede zwischen den Carbaphosphonaten und 7dSh (**56**), welche für eine geringere Aktivität von 7dSh (**56**) verantwortlich sein könnten, sind die zusätzliche Hydroxylgruppe an C-3, sowie die inverse Stereokonfiguration der Hydroxylgruppe an C-4. Die Furanose-Form als mögliches aktives Isomer wird im *Docking*-Kapitel 5 näher untersucht. Im Rahmen dieses Kapitels wird jedoch angenommen, dass die Pyranose-Form das aktive Isomer ist.

Als Negativkontrolle für die Bestimmung der IC₅₀-Aktivität wurde unmodifizierte Sedoheptulose (**23**) verwendet, wobei keine Aktivität im Messbereich bis 1000 µM nachgewiesen werden konnte. Dies untermauert das zwingende Fehlen der Hydroxylgruppe an Position C-7 bei den 7dSh-Derivaten für eine Aktivität am Enzym.

7d7FSh (**63**) als Derivat mit der größten strukturellen Ähnlichkeit zu 7dSh (**56**) zeigt in wässriger Lösung nahezu dasselbe Isomerenverhältnis (68 % β-Furanose, 18 % α-Pyranose und 14 % α-Furanose) und besitzt an der *At*DHQS einen IC₅₀-Wert von 200,4 µM; nah an der Aktivität von 7dSh (**56**). Mögliche Gründe für die Unterschiede in den IC₅₀-Werten könnten der umfangreichere Fluorrest oder dessen elektronische Effekte sein. Dieses Derivat zeigt, dass die wichtige Desoxy-Funktionalität auch durch ein Fluoratom ersetzt werden kann.

5,7dd5FIh (**64**) zeigt einen IC₅₀-Wert von 250,1 µM (*At*DHQS) und ist somit bedeutsam für die hier durchgeführte SAR-Studie. Durch die Einführung der Fluorgruppe an C-5 ist eine Ausbildung der Furanose-Struktur unterbunden. Da zudem die offenkettige Form als nicht plausibel für die Bindung des Inhibitors in der Enzymtasche erscheint, kann daraus geschlossen werden, dass eine oder beide Pyranose-Formen für die Aktivität verantwortlich ist. Dieser Sachverhalt ist ein weiteres wertvolles Ergebnis für die beschriebene kontroverse Diskussion über die Notwendigkeit der Hydroxylgruppe an C-5 für die Bindung im aktiven Zentrum und somit die inhibitorische Aktivität. Dass das Vorhandensein dieser funktionellen Gruppe an C-5 zu einer Verbesserung der Aktivität im Falle der Carbaphosphonate führt, ist aufgrund der zusätzlichen Wechselwirkung mit dem Zn²⁺-Ion logisch begründbar. Im Falle von 7dSh (**56**) und 5,7dd5FIh (**64**) muss jedoch auch das Isomerenverhältnis berücksichtigt werden. Hieraus lässt sich ableiten, dass der Pyranose-Anteil und das Vorhandensein der Hydroxylgruppe an C-5, gleichwertige Gegenspieler sind. Dennoch kann der Einfluss des

Fluoratoms in einer möglichen Stabilisierung der Verbindung im aktiven Zentrum nicht ausgeschlossen werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine geeignetere funktionellen Gruppe an C-5 die eigentliche Basisstruktur 7dSh (**56**) in ihrem IC₅₀-Wert übertreffen könnte.

Die Verbindung 7d5MSh (**65**) zeigte keine inhibitorische *in vitro* Aktivität gegenüber der AtDHQS innerhalb des Messbereiches bis 1000 µM. Die Arbeitshypothese dieser Verbindung bestand darin, dass sie alle Wechselwirkungen analog zur Pyranose-Form der 7dSh (**56**) im aktiven Zentrum eingehen kann. Da jedoch die Verbindung keine Aktivität besitzt, wird von starker sterischer Hinderung, also unzureichendem Platz für die Methoxygruppe im aktiven Zentrum der AtDHQS ausgegangen (Abb. 41).

Die zwei Desoxyheptulosen 7dGh (**66**) und 5,7ddGh (**67**) weisen strukturell den größten Unterschied zu DAHP (**3**) und 7dSh (**56**) auf. Beide Verbindungen liegen in wässriger Lösung, wie in Abbildung 41 und Tabelle 2 gezeigt, in der ²C₅-Konformation vor. Die gemessenen *in vitro* Aktivitäten an der AtDHQS wären mit der zumeist üblichen ⁵C₂-Konformation nicht plausibel zu erklären, da die strukturellen Unterschiede zu DAHP (**3**) sehr markant sind. Eine ⁵C₂-Konformation würde dazu führen, dass entscheidende Wechselwirkungen im aktiven Zentrum nicht ausgebildet werden könnten, da der Großteil der Reste axial ausgerichtet wäre. Die ²C₅-Konformation besitzt hingegen räumlich betrachtet mehr Übereinstimmungen mit DAHP (**3**, Abb. 44). 7dGh (**66**) besitzt eine *in vitro* Aktivität von 464,7 µM und 5,7ddGh (**67**) von 118,3 µM (IC₅₀). Da die beiden Verbindungen in zwei verschiedenen Messserien untersucht wurden, müssen die beiden Aktivitäten in Relation zur Aktivität von 7dSh (**56**), in der jeweiligen Messserie, gesetzt werden (relative Aktivität). Somit besitzt 7dGh (**66**) eine relative Aktivität von $\approx 0,3$ (143,5/464,7; IC₅₀) und 5,7ddGh (**67**) $\approx 0,7$ (85,5/118,3; IC₅₀). Hieraus ist ableitbar, dass die umgekehrte Stereokonfiguration an C-5, im Falle von 7dGh (**66**), zu einer stärkeren Reduktion der Aktivität führt als das Entfernen dieser Hydroxylgruppe. Basierend auf dem Modell des aktiven Zentrums wäre eine Tolerierung der Hydroxylgruppen an C-4 und C-5 in der ²C₅-Konformation denkbar gewesen (Abb. 44). Begründet wird diese Annahme damit, dass C-5 für DAHP (**3**) im aktiven Zentrum oberhalb der Ringebene liegt, die Hydroxylgruppe jedoch aufgrund ihrer Konfiguration und der ⁵C₂-Konformation der Verbindung räumlich nach unten zeigt. Für 7dGh (**66**) würde sich dieser Sachverhalt genau umdrehen, da C-5 unterhalb der Ringebene liegen würde, jedoch die Hydroxylgruppe aufgrund ihrer Konfiguration und der ²C₅-Konformation räumlich nach oben zeigen würde und somit eine ähnliche Position im aktiven Zentrum einnehmen könnte. Für die Hydroxylgruppe an C-4 wäre dies analog

denkbar. Diese Theorie bestätigte sich jedoch nicht, wie anhand der relativen Aktivitäten ersichtlich.

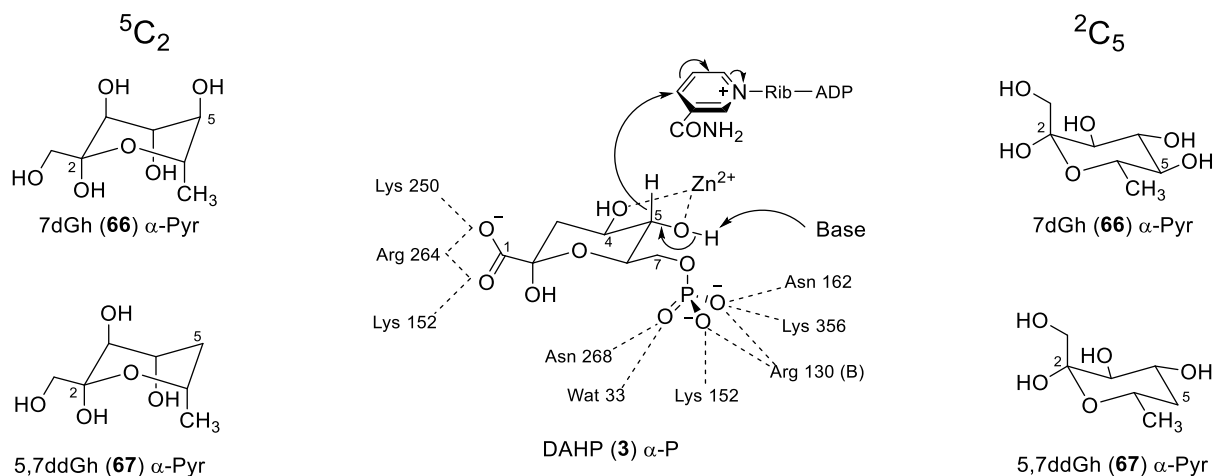


Abbildung 44: Struktureller Vergleich der beiden Verbindungen 7dGh (66) und 5,7ddGh (67) in den Konformationen 5C_2 und 2C_5 , sowie der erste Reaktionsschritt der DHQS-Katalyse von DAHP (3) zu DHQ (4). Die beiden genannten Verbindungen liegen in wässriger Lösung in der 2C_5 -Konformation vor.

4.2.2 *In vivo* Untersuchungen an *A. thaliana*

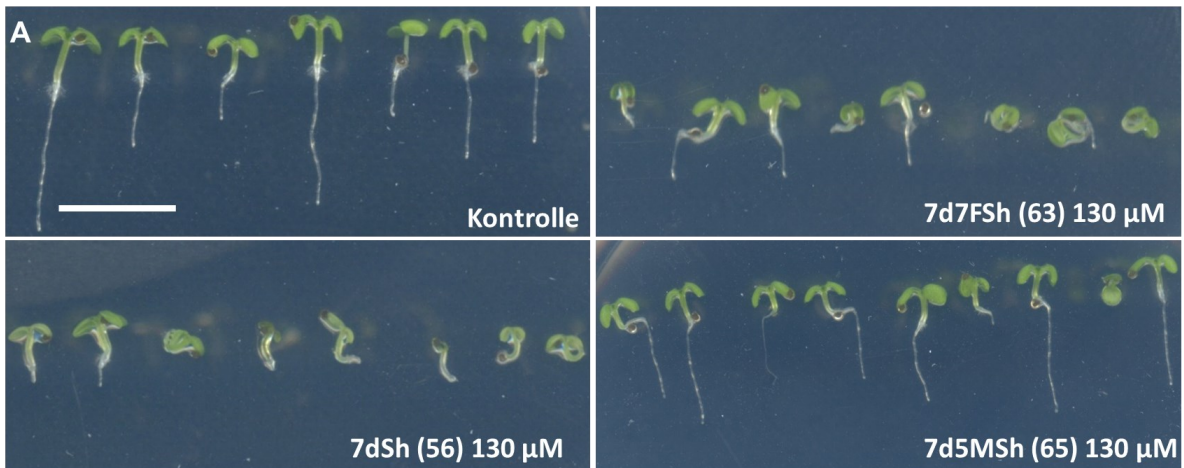
Für die herbizide *in vivo* Aktivität der Verbindungen, wurde analog zu vorherigen Studien an 7dSh (56) die Modellpflanze *A. thaliana* verwendet. Dies gewährleistete zudem eine Vergleichbarkeit mit den *in vitro* IC₅₀-Daten, die ebenfalls an *A. thaliana* bestimmt wurden. Die Untersuchungen fanden im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit Unterstützung von Dr. ÜNER KOLUKISA OGLU (Arbeitsgruppe HARTER, Universität Tübingen) statt. Die Analyse des Keimling-Wachstums wurde in Agarplatten durchgeführt. Die zu testenden Verbindungen wurden in definierter Menge (130 μ M) dem noch flüssigen und lauwarmen Agar zugegeben. Auf den festen Agarplatten wurden die Keimlinge in zwei Reihen ausgelegt. Für einen simultanen Wachstumsstart der Keimlinge, wurden die Platten für 48 h im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Platten vertikal zur Lichtquelle ausgerichtet und bei 22 °C und konstanter Beleuchtung für insgesamt sieben Tage kultiviert. Durch die vertikale Ausrichtung wuchsen die Pflanzen auf der Oberfläche des Agars, was die anschließende Analyse vereinfachte. Die Agarplatten wurden anschließend fotografiert und die Wurzellängen mittels der Software FIJI vermessen. In Abbildung 45A ist beispielhaft das Wachstum von Kontrollpflanzen sowie mit 7dSh (56)-, 7d7FSh (63) und 7d5MSh (65)-behandelten Pflanzen dargestellt. Die Wurzellängen wurden anschließend mittels der Software GRAPHPAD statistisch aufgearbeitet. Die Daten sind in einem Box-Whisker-Plot

dargestellt, um visuell die Verteilung der Wurzellängen abzubilden, wobei diese auf die Länge der unbehandelten Kontrollpflanzen prozentual skaliert wurden (Abb. 45B). Zudem wurde für jede getestete Verbindung ein t-Test bezogen auf die Kontrollpflanzen durchgeführt, um statistisch zu ermitteln, bei welchen Verbindungen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle gegeben ist. Die Anzahl an Sternen über den jeweiligen Datensätzen entspricht hierbei dem jeweiligen p -Wert, welcher ein Maß dafür ist, wie stark ein Datensatz von einem anderen abweicht (* p -Wert < 0,05; ** p -Wert < 0,01; **** p -Wert < 0,0001). Je geringer der p -Wert, desto wahrscheinlicher ist es, dass die beiden Datensätze sich signifikant unterscheiden. Datensätze die mit „n.s.“ deklariert sind weisen statistisch keinen signifikanten Unterschied zur Wurzellänge der Kontrollpflanzen auf.

Nach 7 Tagen des Wachstums zeigten die Keimlinge der unbehandelten Kontrollplatten normales Wurzelwachstum und grüne Keimblätter (Kotyledone). Des Weiteren zeigte sich herkömmlicher Gravitropismus (Abb. 45A). Gravitropismus bezeichnet die Ausrichtung der Pflanzenorgane, wobei Wurzeln mit und Sprosse entgegen der Schwerkraft wachsen.

Die Desoxy-Verbindungen 7dSh (**56**), 7d7FSh (**63**) und 5,7ddGh (**67**) beeinflussten das Wachstum und die Morphologie der Keimlinge signifikant, ersichtlich durch kürzere Wurzeln, kleinere Keimblätter und teilweise beeinträchtigten Gravitropismus. Die Ergebnisse von 7dSh (**56**) stimmen mit vorherigen Studien an *A. thaliana* überein.^[66] Die etwas geringere Aktivität von 7d7FSh (**63**) im Vergleich zu 7dSh (**56**) ist in Übereinstimmung mit der IC₅₀-Studie, sowie mit den *in vivo* Aktivitäten an *A. variabilis* (Kapitel 4.1). Die *in vivo* Aktivität von 5,7ddGh (**67**) an *A. thaliana* bildet ebenfalls die Ergebnisse der IC₅₀-Messungen an der *AtDHQS* ab, wobei die geringere *in vivo* Aktivität im Vergleich zu 7d7FSh (**63**) möglicherweise mit der Aufnahme der Verbindung in die Pflanze zusammenhängt.

Die Verbindungen 5,7dd5FIh (**64**), 7dGh (**66**), COOH-7dSh (**68**) und Perac-7dSh (**69**) zeigten keine statistischen Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollpflanzen. Im Falle von 5,7dd5FIh (**64**) kann die Hypothese formuliert werden, dass basierend auf dem gemessenen IC₅₀-Wert, höchstwahrscheinlich eine fehlende Aufnahme der Verbindung in die Pflanzenzellen der Grund für die fehlende *in vivo* Aktivität ist. Für 7dGh (**66**) sind sowohl der hohe IC₅₀-Wert als auch die Aufnahme plausible Gründe für den fehlenden Effekt.



B

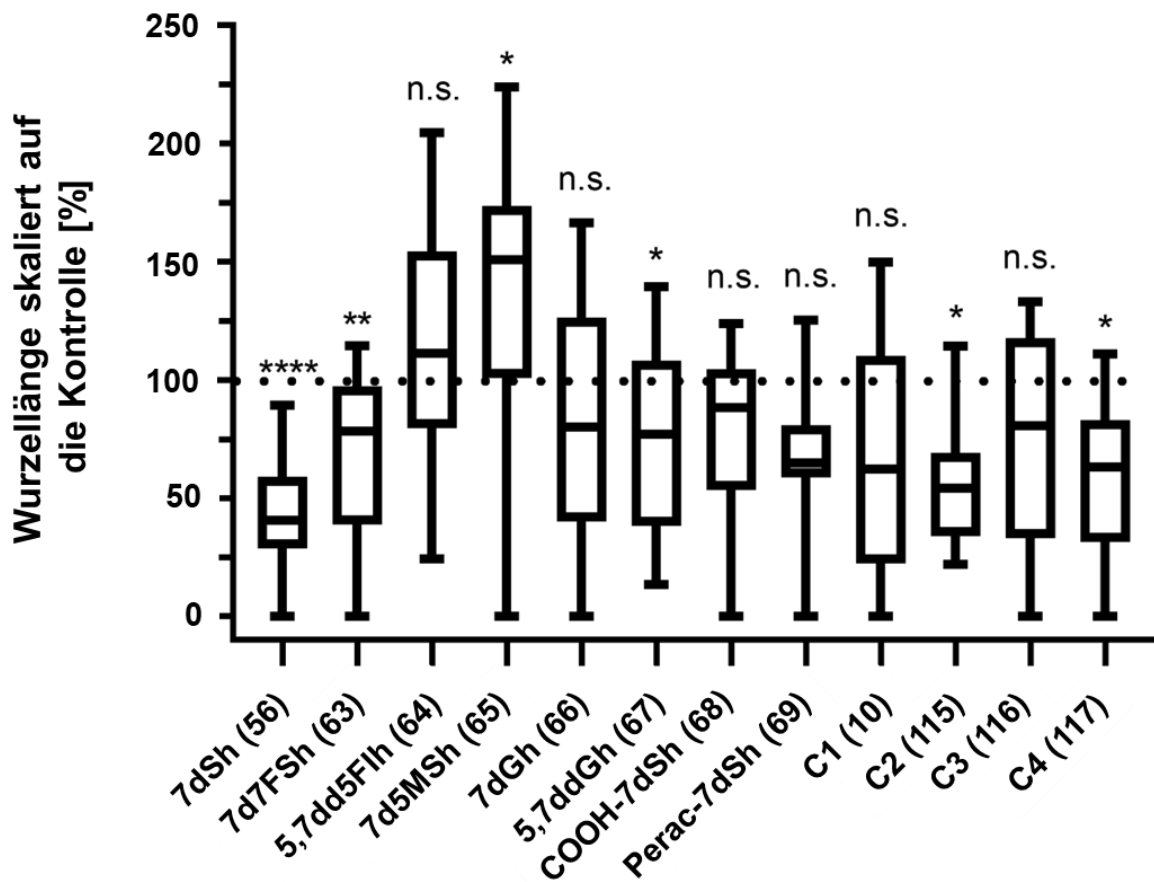


Abbildung 45: Effekte der synthetisierten 7dSh-Derivate und verfügbaren Carbaphosphonate auf das Wachstum von *A. thaliana* Keimlingen. A) Morphologisches Aussehen von *A. thaliana* Keimlingen 7 Tage nach Auskeimung. „Kontrolle“ (oben links): Wachstum auf halbkonzentriertem Agar mit Murashige-Skoog-Medium (MSO) ohne Zusatz. „7dSh (56) 130 µM“ (unten links): Wachstum auf MSO mit Zusatz von 130 µM 7dSh (56). „7d7FSh (63) 130 µM“ (oben rechts): Wachstum auf MSO mit Zusatz von 130 µM 7d7FSh (63). „7d5MSh (65) 130 µM“ (unten rechts): Wachstum auf MSO mit Zusatz von 130 µM 7d5MSh (65). Weiße Maßstabsleiste = 5 mm B) Box-Whisker-Plot der Wurzellängen, 7 Tage nach Auskeimung mit jeweils 130 µM der angegebenen Verbindung. Der Mittelwert bezogen auf die Kontrolle wurde mittels eines ungepaarten t-Tests untersucht (* p -Wert < 0,05; ** p -Wert < 0,01; **** p -Wert < 0,0001; n.s.: kein signifikanter Unterschied messbar). Box-Whisker-Plot repräsentiert die Werte von mindestens 16 Keimlingen.

Für die Verbindung COOH-7dSh (**69**) ist kein IC₅₀-Wert bestimmt worden, weshalb der Grund für die fehlende *in vivo* Aktivität nur gemutmaßt werden kann. Jedoch kann aufgrund der Strukturvergleiche mit DAHP (**3**) und 7dSh (**56**) vermutet werden, dass eine Aktivität am isolierten Enzym wahrscheinlich ist. Somit wäre erneut die aktive Aufnahme in die Zellen für die fehlende *in vivo* Aktivität verantwortlich. Grund hierfür wird die negative Ladung der Carboxylgruppe sein, dies wurde bereits für die Carbaphosphonate postuliert. Der Ionisierungszustand bei physiologischem pH, verhindert hierbei die Penetration der Zellwand und Membran, so dass eine *in vivo* Aktivität ausbleibt. Diese Hypothese ist im Zusammenhang mit der Penetration von bakteriellen Membranen und Zellwänden aufgestellt worden und teilweise auf Pflanzenzellen übertragbar.^[104]

Für die peracetylierte 7-Desoxy-sedoheptulose (Perac-7dSh, **69**), als potenzielles Pro-Drug, ist von einer direkten Aktivität ohne Freisetzung von 7dSh (**56**) aufgrund der fünf raumeinnehmenden Acetylschutzgruppen nicht auszugehen. Somit könnte sowohl die fehlende Aufnahme in die Zellen als auch die ausbleibende Entschützung in oder außerhalb der Pflanzenzelle, für die fehlende Aktivität verantwortlich sein.

Mit 7d5MSh (**65**) behandelte Keimlinge bildeten statistisch ermittelt längeren Wurzel als die Kontrolle aus (Abb. 45A, B). Basierend auf dem Ergebnis der IC₅₀-Studie wurde mit keiner Aktivität gerechnet. Ein möglicher Grund für das stimulierte Wurzelwachstum könnte das Auftreten einer Hormesis sein. Hormesis beschreibt einen biologischen Effekt, bei welchem geringe Mengen einer schädlichen Substanz eine positive Wirkung auf den Organismus haben kann. Dieser Effekt ist im Falle von Glyphosat sehr gut beschrieben. Subletale Konzentrationen führten hierbei zu verstärktem Pflanzenwachstum.^[109]

Im Falle von Carbaphosphonat **C1 (10)** ist, in Übereinstimmung mit der Literatur, kein wachstumsbeeinträchtigender Effekt nachweisbar,^[18] was wahrscheinlich erneut an der fehlenden aktiven Aufnahme, aufgrund des Ionisierungszustandes, liegt. Die *Prodrug*-Derivate **C2 (115)** und **C4 (117)** zeigen hingegen eine statistische Reduktion der Wurzellängen. Dies spricht dafür, dass die Einführung der Isopropyl-Gruppe als *Prodrug*-Ansatz einen Transport in die Zellen ermöglicht. Da beide Verbindungen in ihrer *Prodrug*-Struktur *in vitro* Aktivität besitzen (messbarer IC₅₀-Wert), kann so nicht aufgeklärt werden, ob eine Entschützung der Verbindungen in der Zelle stattfindet.

Im Falle von **C3 (116)** konnte hingegen keine *in vivo* Aktivität festgestellt werden. Somit ist entweder die Aufnahme aufgrund der Methylveresterung gehindert oder bei der Messung des IC₅₀-Wertes ist ein Fehler aufgetreten (falsch positives Ergebnis). Wie schon zuvor genannt, ist die Stabilität der *Prodrug*-Derivate im Puffersystem der IC₅₀-Messung nicht untersucht worden. Hierfür bedarf es einer detaillierten Untersuchung der Carbaphosphonate **C2 – C4**, was jedoch nicht Gegenstand dieser Desoxyheptulose-Studie war.

In einem Experiment, durchgeführt von MARVIN BRAUN (ZMBP, Arbeitsgruppe KLAUS HARTER), wurde die intrazelluläre Akkumulation von 7dSh (**56**) und 7d7FSh (**63**) in *A. thaliana* untersucht. Hierfür wurden die Pflanzen nach dem Wachstum auf Agarplatten (jeweils mit Inhibitor versetzt) zuerst mehrfach mit deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend für eine GC-MS-Analyse präpariert und derivatisiert. Zur Kontrolle der Extraktions- und Derivatisierungseffizienz wurde die chemisch dargestellte ¹³C₅-7dSh (**56***) genutzt. Sowohl 7dSh (**56**) als auch 7d7FSh (**63**) konnten in *A. thaliana* nachgewiesen werden (Abb. 46A, B).^[106] Diese Informationen decken sich mit den durchgeführten *in vivo* Untersuchungen an *A. thaliana*.

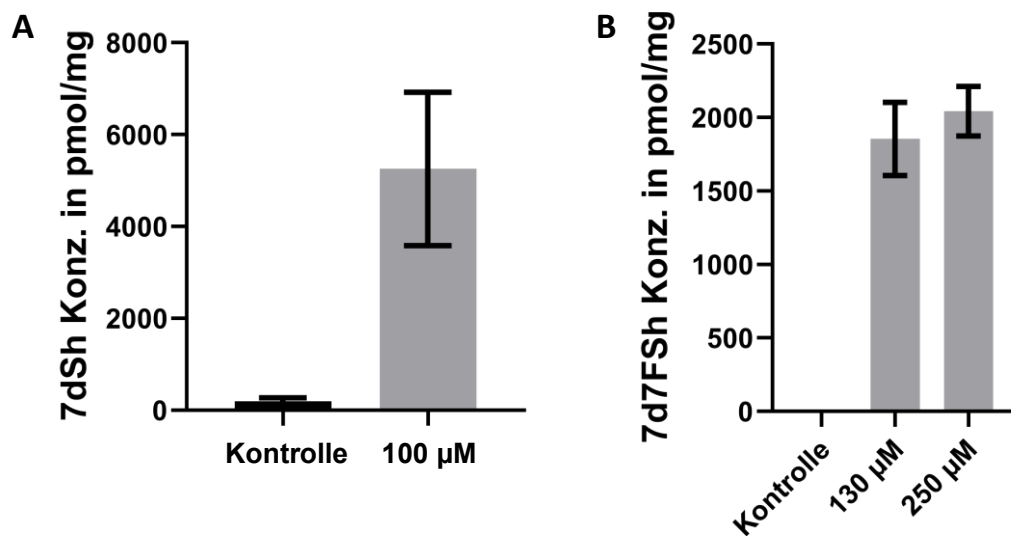


Abbildung 46: Statistische Untersuchung der intrazellulären Akkumulation von A) 7dSh (**56**) und B) 7d7FSh (**63**). Kontrolle: Wachstum auf Agarplatte ohne Inhibitor. Abgebildet ist die durchschnittliche Konzentration der jeweiligen Verbindung in drei *A. thaliana* Keimlingen 20 Tage nach Auskeimung. Der Mittelwert bezogen auf die Kontrolle wurde mittels eines Wilcox-Tests untersucht (p -Wert < 0,05).

4.3 Aufklärung der Biosynthese von 7dSh (56) über ¹³C-markierte Verbindungen

Im Rahmen einer gemeinschaftlichen Forschung mit JOHANNA RAPP (Arbeitsgruppe FORCHHAMMER) sollte die Biosynthese von 7dSh (56), im cyanobakteriellen Produzentenstamm *S. elongatus*, aufgeklärt werden (Kapitel 3.1). Entsprechend der von BRILISAUER etablierten und im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimierten Synthese von 7dSh (56) mittels Transketolase wurde von BRILISAUER und RAPP die Hypothese aufgestellt, dass der Produzentenstamm *S. elongatus* die Verbindung ebenfalls Transketolase-basiert ausgehend von 5-Desoxy-ribose (58) darstellt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ¹³C₅-5-Desoxy-ribose (58*) im Rahmen dieser Arbeit chemisch-synthetisch dargestellt (Kapitel 3.1). Das ¹³C-markierte Edukt wurde durch RAPP in definierter Konzentration dem Kulturmedium von *S. elongatus* zugegeben. Für einen eindeutigen Nachweis der Biosynthese von ¹³C₅-7dSh (56*) wurde zunächst ausgehend von ¹³C₅-5-Desoxy-ribose (58*) ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit mittels Transketolase ¹³C₅-7dSh (56*) chemoenzymatisch dargestellt. Da der C₂-Donor im Falle der Biosynthese nicht ¹³C-markiert ist, wurde in der Labor-Synthese ebenfalls unmarkiertes Hydroxypyruvat (46) als C₂-Donor verwendet. Die ¹³C-markierten Verbindungen 58* und 56* wurden daraufhin mittels GC-MS als Standards vermessen, um sowohl Retentionszeit als auch MS/MS-Fragmentierung als Referenz zu erhalten. Anschließend wurden mittels GC-MS die Konzentrationsänderungen von ¹³C₅-5-Desoxy-ribose (58*) und ¹³C₅-7dSh (56*) überwacht.

Mittels der ¹³C-markierten Syntheseprodukte 56* und 58* konnte RAPP eindeutig die Aufnahme von ¹³C₅-5-Desoxy-ribose (58*) in die cyanobakteriellen Zellen nachweisen. Des Weiteren konnte die Bildung der Zielverbindung ¹³C₅-7dSh (56*) durch die gewählte GC-MS-Analytik bestätigt werden. Dieses Experiment bewies die Theorie, dass 5-Desoxy-ribose (58) ebenfalls, wie in der gewählten chemoenzymatischen Synthese, als Edukt bei der Biosynthese von 7dSh (56) genutzt wird.^[110]

5. Molecular Docking-Studie

Das *Docking*-Programm FITTED, als Bestandteil der *Molecular FORECASTER* Software, verspricht Einblicke in die Bindungseigenschaften von Inhibitoren an Enzyme (Kapitel 1.7). Das *Docking* verschiedener Desoxyheptulosen und Carbaphosphonate, in Kombination mit möglichen Isomeren, soll aufzeigen, ob die biologischen Ergebnisse (*in vivo* und *in vitro*) hiermit gestützt werden oder ob es identifizierbare Unterschiede gibt, die bei der Interpretation der Struktur-Wirkungs-Beziehung berücksichtigt werden sollten.

Da FITTED eine Endverbraucher-Software ist, die nur begrenzte Einblicke in die durchgeführten Berechnungen erlaubt und zudem bestimmte Parameter nicht genauer definiert sind, werden die Standardbedingungen für die Berechnungen angewendet. Somit sollen die erhaltenen Ergebnisse als Zusatzinformationen und als mögliche Unterstützung der aufgestellten Hypothesen in die SAR-Studie mit einbezogen werden.

Vor dem *Docking* der verschiedenen Verbindungen muss ein *self-docking* durchgeführt werden. Hierbei wird überprüft, ob die Software den in der Kristallstruktur enthaltenen Liganden, unter Vorgabe der Position, in der korrekten Orientierung und der passenden Konformation im aktiven Zentrum dockt. Ist dies erfüllt, kann die Software mit hoher Wahrscheinlichkeit alle nötigen Wechselwirkungen im aktiven Zentrum erkennen und ist für das *Docking* einsetzbar. Als DHQS-Proteinstruktur wurde die PDB-Datei 1XAJ von *Staphylococcus aureus* genutzt, da zur DHQS von *A. thaliana* keine Einträge in der PROTEIN DATA BANK existieren. 1XAJ besitzt hierbei die größte Ähnlichkeit zur DHQS von *A. thaliana*. Des Weiteren sind alle Liganden in der Kristallstruktur enthalten (Zn^{2+} , NAD^+ und Carbaphosphonat **C1 (10)**). Das *self-docking* entfernt hierbei den Liganden Carbaphosphonat **C1 (10)** und soll diesen anschließend erneut ins aktive Zentrum docken. (Abb. 47A).

Die grafische Überlagerung zwischen **C1 (10)** aus der Kristallstruktur (Grau) und **C1 (10)** aus dem *Docking* (Magenta) ist sehr hoch. Dies beweist, dass die FITTED-Software mit der DHQS und **C1 (10)** als Liganden umgehen kann. Eine freie Energie von -106,6 kcal/mol bestätigt zudem, dass **C1 (10)** fest im aktiven Zentrum sitzt.

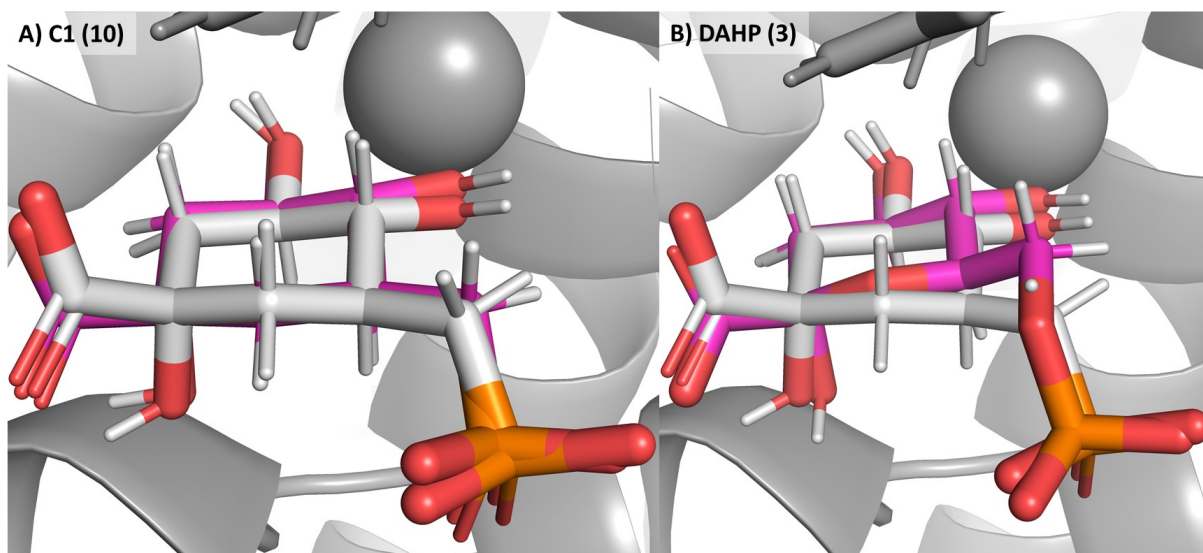


Abbildung 47: *Semi-flexibel Docking* der Verbindungen A) C1 (**10**) und B) DAHP (**3**) an das aktive Zentrum der DHQS. PDB-Datei: 1XAJ beinhaltet Proteinstruktur (grau), C1-Inhibitor (grau mit farbig hervorgehobenen funktionellen Gruppen), Zn^{2+} -Metallion (graue Kugel) und NAD (oben grau angedeutet). Gedockte Verbindung ist in Magenta hervorgehoben. Im Falle von C1 wurde ein *self-docking* durchgeführt.

Basierend auf dem erfolgreichen *self-docking* Ergebnis mit Carbaphosphonat C1 (**10**) konnte die *Docking*-Studie mit einer Vielzahl von Verbindungen durchgeführt werden. Die gedockten Verbindungen, unterteilt in die jeweiligen Isomere und Anomere, mit den dazugehörigen freien Energien sowie der Orientierung im aktiven Zentrum und der Konformation sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die „Orientierung“ beschreibt hierbei, ob die Verbindung dieselbe Ausrichtung im aktiven Zentrum, analog zu DAHP (**3**) besitzt, bezogen auf die Nummerierung der Kohlenstoffatome von C-1 bis C-7. Ist die Orientierung nicht identisch, sind die Positionen C-1 und C-7 vertauscht, was ca. einer 180° Drehung der Verbindung entspricht (Abb. 48).

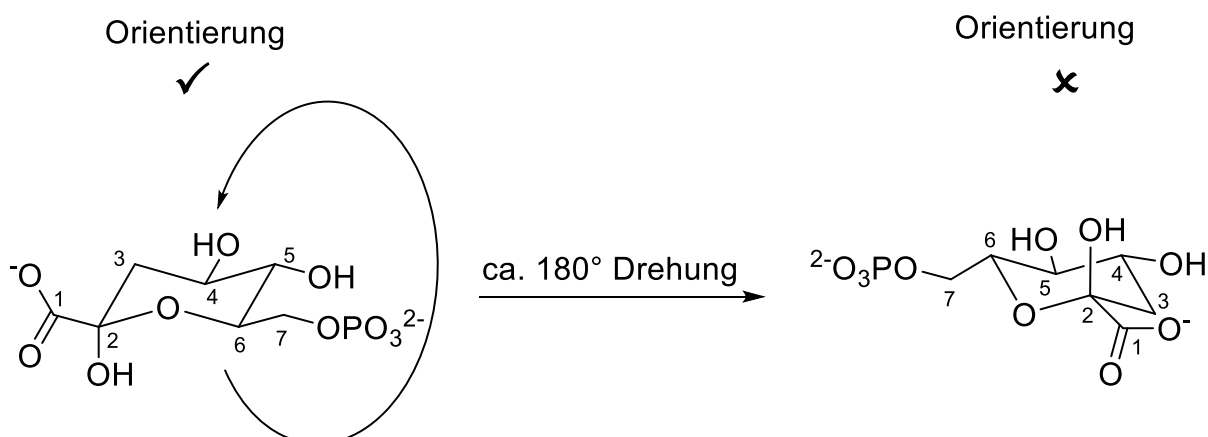


Abbildung 48: Skizzierung der Orientierung im aktiven Zentrum, beispielhaft an DAHP (**3**). Links ist die korrekte Orientierung im aktiven Zentrum, analog zur Kristallstruktur. Rechts ist die um ca. 180° verdrehte Orientierung, welche durch das Programm FITTED für bestimmte Isomere gedockt wurde.

Tabelle 5: Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse der *Docking*-Studie aller berechneter Verbindungen mit den entsprechenden Isomeren und Anomeren (vgl. Abb. 41). Aufgeführt sind die jeweilige Energie im aktiven Zentrum, sowie die Orientierung im Vergleich zu DAHP (**3**) und die Konformation. Fur: Furanose; Pyr: Pyranose.

Verbindung	Energie [kcal/mol]	Orientierung	Konformation
DAHP (3) α -P	-102,2	✓	Sessel
Carbaphosphonat C1 (10)	-106,6	✓	Sessel
4-Desoxy-Carbaph. (122)	-99,5	✓	Sessel
5-Desoxy-Carbaph. (123)	-95,2	✓	Sessel
C2 (115)	-36,3	✓	Twist
C3 (116)	+0,1	✓	Sessel
C4 (117)	-91,6	✓	Sessel
7dSh (56a) β -Fur	-61,3	✓	
7dSh (56b) α -Pyr	-63,1	✗	Sessel
7dSh (56c) α -Fur	-64,9	✗	
7d7FSh (63a) β -Fur	-65,2	✓	
7d7FSh (63b) α -Pyr	-64,2	✗	Sessel
7d7FSh (63c) α -Fur	-63,2	✗	
5,7dd5FIh (64a) α -Pyr	-56,0	✓	Sessel
5,7dd5FIh (64b) β -Pyr	-57,8	✓	Sessel
7d5MSh (65a) α -Pyr	-51,5	✓	Boot
7d5MSh (65b) β -Pyr	-54,3	✓	Sessel
7dGh (66) α -Pyr	-63,9	✓	Boot
5,7ddGh (67) α -Pyr	-60,1	✓	Sessel
COOH-7dSh (68a) β -Fur	-69,3	✗	
COOH-7dSh (68b) α -Pyr	-69,3	✓	Sessel
COOH-7dSh (68c) α -Fur	-70,1	✗	
Sedoheptulose (24a) β -Fur	-68,8	✗	
Sedoheptulose (24b) α -Pyr	-68,6	✗	Sessel
Sedoheptulose (24c) α -Fur	-71,0	✗	

Die Ergebnisse werden entsprechend der beiden Gruppen der Carbaphosphonate (**C1** – **C4**) und der 7dSh-Derivate (**56**, **63** – **68**) getrennt analysiert, da sich bei den beiden Gruppen entscheidende Unterschiede in den *Docking*-Ergebnissen zeigen und die Grenzen der *Docking*-Software erkennbar werden. Als natürliches Substrat der DHQS wurde DAHP (**3**) ebenfalls in das aktive Zentrum gedockt. Analog zur Literatur konnte DAHP mit einer freien Energie von -102,2 kcal/mol und der korrekten Orientierung im aktiven Zentrum (Abb. 47B), plausibel gedockt werden.^[13] Die geringere freie Energie von **C1** von -4,4 kcal/mol im Vergleich zu DAHP (**3**) bekräftigt, dass es sich um einen guten *in vitro* Inhibitor handelt.

Docking-Experimente zu den Carbaphosphonate

Die freien Energien für die Verbindungen 4-Desoxy-Carbaphosphonat (**122**, -99,5 kcal/mol) und 5-Desoxy-Carbaphosphonat (**123**, -95,2 kcal/mol) bekräftigen die vermutete starke Bindung, ergründet auf den literaturbekannten niedrigen IC₅₀-Werten in den biologischen *in vitro* Untersuchungen.^[107] Im Vergleich zu **C1 (10)** ist jedoch sowohl ein Energie- als auch ein Aktivitätsverlust erkennbar, was an der jeweils fehlenden Hydroxylgruppe liegt, die Verbindungen könnten jedoch trotz dessen respektable Inhibitoren sein. Zudem stimmen die gedockten Positionen mit der Kristallstruktur überein (Ab. 49A, B). Deutliche Unterschiede zwischen den IC₅₀-Aktivitäten und den *Docking*-Ergebnissen sind für die Carbaphosphonate **C2 – C4** erkennbar. Beispielsweise wird für **C4 (117)** eine freie Energie von -91,6 kcal/mol berechnet. Im Vergleich werden für 4-Desoxy- und 5-Desoxy-Carbaphosphonat (**122**, **123**) ähnliche Energien berechnet, diese sind jedoch laut Literatur merklich schlechtere *in vitro* Inhibitoren im Vergleich zu **C4 (117)**.^[107] Folglich können die *Docking*-Ergebnisse lediglich zur groben Einordnung herangezogen werden. Die Orientierung im aktiven Zentrum zeigt für **C4 (117)** eine gute Überlappung mit der Kristallstruktur. Die Isopropyl-Einheit kann einen freien Raum unter der Phosphonat-Einheit ausfüllen (Abb. 49E). Für die Carbaphosphonate **C2 (115)**, -36,3 kcal/mol) und **C3 (116)**, +0,1 kcal/mol) werden freie Energien berechnet, die nicht mit den bestimmten IC₅₀-Werten vergleichbar sind. Gemäß *Docking* sollte **C2 (115)** der bessere *in vitro* Inhibitor sein. Dies deckt sich jedoch nicht mit den gemessenen IC₅₀-Werten (**C2**: 929,8 µM; **C3**: 147,6 µM). Das *Docking*-Ergebnis folgt hiermit der Theorie von TIAN *et al.*, da **C2** im Vergleich zu **C3** einen negativen Ionisierungsstatus ausbilden kann und somit der bessere Inhibitor sein sollte.^[104] Die dreidimensionale Darstellung zeigt sehr anschaulich, dass **C2 (115)** und **C3 (116)** mittels FITTED nicht mehr korrekt in das aktive Zentrum gedockt werden können (Abb. 49C, D), da die zusätzlichen Reste viel Raum einnehmen und große Ladungsverluste mit sich bringen. **C2 (115)** liegt zudem nicht in der klassischen Sesselkonformation vor, wie das eigentliche Substrat, sondern in der Twistkonformation. Ob in diesem Fall die *Docking*-Software an seine Grenzen stößt oder ein Fehler bei der Bestimmung der IC₅₀-Werte der Carbaphosphonate **C2 – C4** für die Differenzen verantwortlich ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht zweifelsfrei geklärt werden. Die Theorie von TIAN *et al.* und der damit einhergehende Widerspruch der Aktivitäten zwischen **C2 (115)** und **C3 (116)** wurde schon in Kapitel 4.2 aufgegriffen. Nichtsdestotrotz bestätigt dies erneut, dass die IC₅₀-Werte der Carbaphosphonate **C2 – C4** kritisch betrachtet werden müssen.

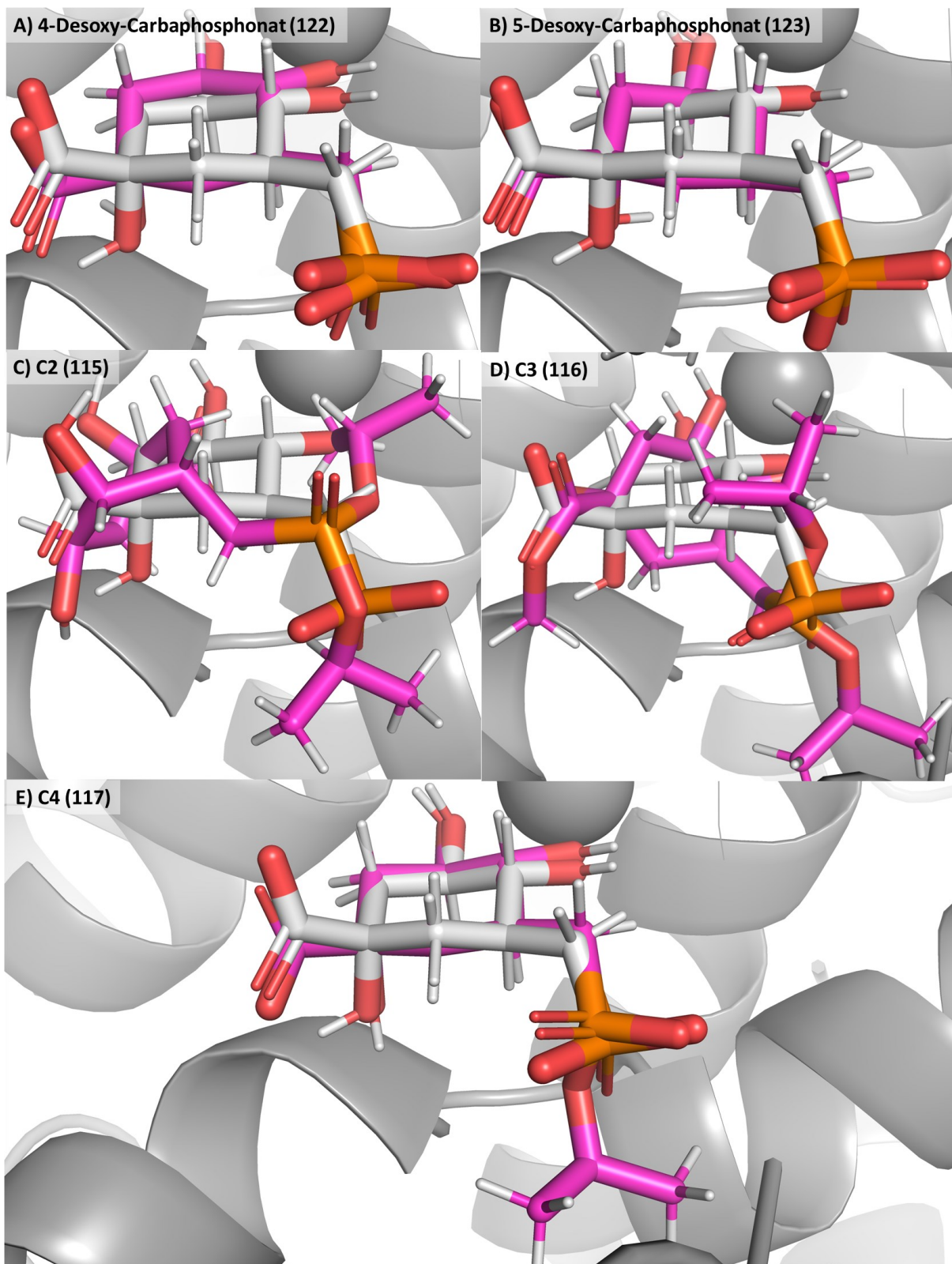


Abbildung 49: *Semi-flexibel Docking* der Verbindungen A) 4-Desoxy-Carbaphosphonat (**122**), B) 5-Desoxy-Carbaphosphonat (**123**), C) C2 (**115**), D) C3 (**116**) und E) C4 (**117**) an das aktive Zentrum der DHQS. PDB-Datei: 1XAJ. Gedockte Verbindungen sind in Magenta hervorgehoben.

Docking-Experimente zu den Desoxyheptulosen

Das *Docking* der 7dSh-Analoga zeigte deutlich die Schwachpunkte der FITTED-Software auf. Der Vergleich der drei 7dSh Isomere (**56a-c**, Abb. 50A-C) zeigt, dass einzig die β -Furanose-Form dieselbe räumliche Orientierung im Vergleich mit der Kristallstruktur aufweist (Abb. 50A). Die beiden anderen Isomere sind hingegen so verdreht, dass die C-7 Methylgruppe von 7dSh (**56**) zur C-1 Carboxylgruppe der Kristallstruktur zeigt (Abb. 50B, C). Die Verbindung 7d7FSh (**63**) weist dieselben räumlichen Orientierungen auf (nicht abgebildet). Ein plausibler Grund für diese invertierte Orientierung könnte der Ausgleich der fehlenden polaren Wechselwirkungen der Phosphonat-Gruppe sein, da die C-7 Methylgruppe keine polaren Interaktionen eingehen kann. Das Fehlen der Hydroxyl-Gruppe ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt die Ursache für die Inhibierungseigenschaften. Hieraus folgt das größte Problem der FITTED-Software. Diese versucht vor allem polare Interaktionen auszugleichen, ohne entscheiden zu können, welche dieser polaren Interaktionen für die Inhibierung relevant sind und welche nicht, weshalb beispielsweise die Isomere der Sedoheptulose (**24a-c**) bessere Energiewerte liefern (-68,6 bis -71,0 kcal/mol) als die entsprechenden 7dSh-Isomere. Gleichzeitig besitzt jedoch Sedoheptulose (**24**) keine inhibitorische *in vivo* Aktivität in unserem Testmodell (vgl. Kapitel 4.2.1, Tab. 4). Somit kann die C-7 Methylgruppe als Alleinstellungsmerkmal der Klasse der 7dSh-Inhibitoren nicht durch diese Software korrekt abgebildet werden. Zudem ist sowohl bei der α -Furanose- als auch bei der α -Pyranose-Form ersichtlich, dass die FITTED-Software versucht, die Hydroxylgruppe der Kristallstruktur an C-4 auszugleichen (Abb. 50B, C). Im Falle von COOH-7dSh (**68**) besitzt lediglich die α -Pyranose-Form die korrekte Orientierung (Abb. 50E).

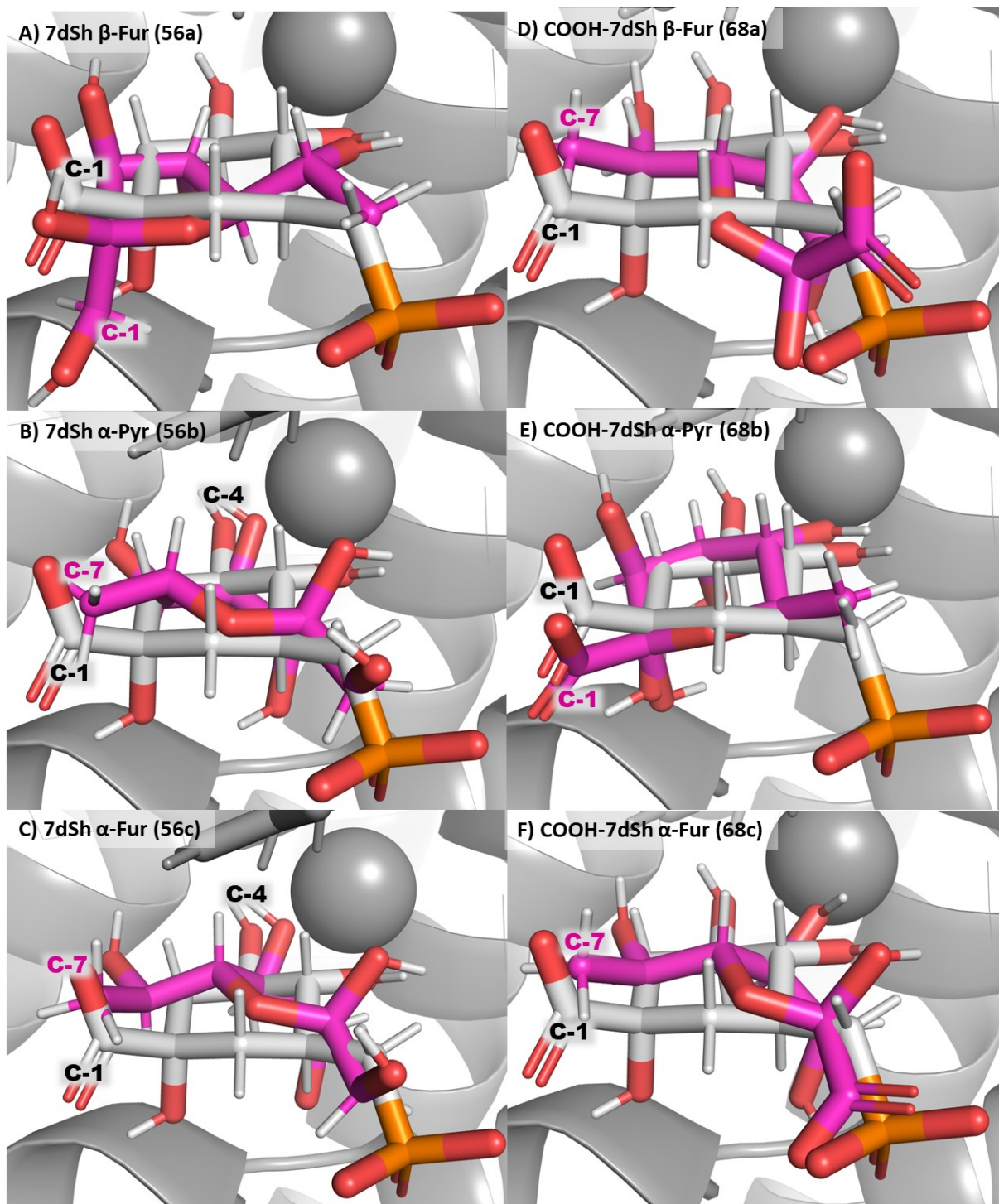


Abbildung 50: *Semi-flexibel Docking* der Verbindungen A) 7dSh (**56a**) β -Furanose (β -Fur), B) 7dSh (**56b**) α -Pyranose (α -Pyr), C) 7dSh (**56c**) α -Furanose (α -Fur), D) COOH-7dSh (**68a**) β -Fur, E) COOH-7dSh (**68b**) α -Pyr und F) COOH-7dSh (**68c**) α -Fur an das aktive Zentrum der DHQS. PDB-Datei: 1XAJ. Gedockte Verbindungen sind in Magenta hervorgehoben.

Für die Pyranose-Derivate der 7dSh (**64** – **67**) wird die korrekte Orientierung durchweg eingehalten (Abb. 51A-F). Im Falle der 7d5MSh (**65**) bestätigen die Energien (α -Pyr: -51,5 kcal/mol und β -Pyr: -54,3 kcal/mol) eine geringe Stabilität im aktiven Zentrum, was sich mit der fehlenden *in vitro* Aktivität deckt.

Die α -Pyranose-Form der 7d5MSh (**65a**), sowie 7dGh (**66**) liegen nicht in der üblichen Sesselkonformation vor, sondern in der Bootkonformation (Abb. 51C, E). Dies führt dazu, dass die Interaktion der C-4 Hydroxylgruppe in der Kristallstruktur von **C1** (**10**) oder DAHP (**3**) ebenfalls ausgebildet werden könnte. Die β -Pyranosen von 5,7dd5Flh (**64b**) und 7d5MSh (**65b**) liegen aufgrund der β -Form gekippt im aktiven Zentrum (Abb. 51B, D).

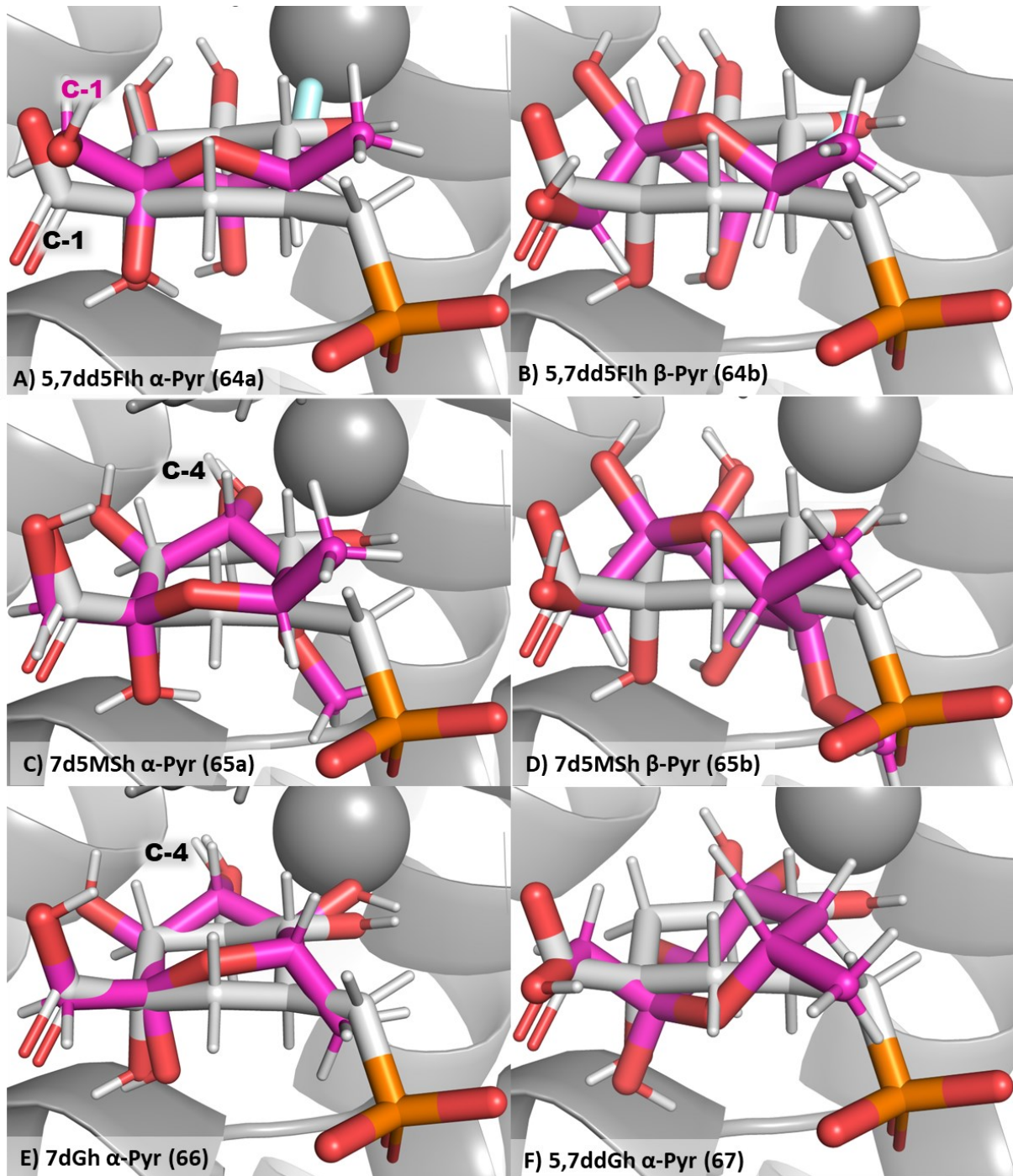


Abbildung 51: *Semi-flexibel Docking* der Verbindungen A) 5,7dd5Flh (**64a**) α -Pyranose (α -Pyr), B) 5,7dd5Flh (**64b**) β -Pyr, C) 7d5MSh (**65a**) α -Pyr, D) 7d5MSh (**65b**) β -Pyr, E) 7dGh (**66**) α -Pyr und F) 5,7ddGh (**67**) α -Pyr an das aktive Zentrum der DHQS. PDB-Datei: 1XAJ. Gedockte Verbindungen sind in Magenta hervorgehoben.

Zusammenfassend kann das *Docking*-Tool FITTED die Klasse der Carbaphosphonate gut abbilden und zumeist plausible Energien und Orientierungen ermitteln. Ausschlaggebend ist die Phosphonatgruppe, welche klare Prioritäten für die Ligandenausrichtung im aktiven Zentrum setzt. Die *Prodrug*-Derivate **C2 (115)**, **C3 (116)** und **C4 (117)** führten teilweise zu nicht eindeutigen Ergebnissen, was sich erneut mit der Theorie von TIAN *et al.* deckt und aufzeigt, dass die hierfür bestimmten IC₅₀-Werte mit Vorsicht betrachtet werden müssen.^[104]

Im Falle der Gruppe der 7dSh-Analoga reduziert sich die Aussagekraft des *Docking*-Tools, unter den verwendeten Grundeinstellungen, beispielsweise ändern sich die räumlichen Orientierungen teilweise ohne ersichtlichen Grund. Die aktuelle Hypothese, weshalb das *Docking*-Tool beim *Docking* der Desoxyheptulosen solch widersprüchliche Ergebnisse liefert, ist das Fehlen einer hoch geladenen und damit stark bindenden funktionellen Gruppe wie einer Phosphonat- oder Phosphatgruppe. Diese Gruppe wird als entscheidend von der Software erkannt und somit für eine gute Enzym-Inhibitor-Interaktion als notwendig erachtet. Im Falle der Desoxyheptulosen wird die Summe schwächerer Wechselwirkungen im aktiven Zentrum für die Bindungseffekte verantwortlich sein, welche jedoch möglicherweise nicht korrekt mit den verwendeten Grundeinstellungen abgebildet werden können.

Anhand dieser *Molecular Docking*-Studie können Impulse für zukünftige Forschungsansätze abgeleitet werden. So ist unter anderem die negative Ladung an C-7 ein entscheidender Faktor für die Bindungsstärke im aktiven Zentrum. Die Darstellung eines 7dSh-Derivates mit geladener funktioneller Gruppe an C-7 birgt möglicherweise Potenzial, bringt jedoch auch gleichzeitig Probleme, wie an der fehlenden *in vivo* Aktivität von COOH-7dSh (**68**) gegenüber *A. thaliana* ersichtlich ist. Hier wird die Anwendung des *Prodrug*-Designs unabdingbar sein, um die negative Ladung zu maskieren und so die Aufnahme der Verbindung in die Zellen zu erleichtern.

6. Erklärung über den Rahmen der gemeinschaftlichen Arbeiten

Die Arbeit war Teil des Forschungsprojektes „Glykobiologie/Glykobiotechnologie“ des Ministeriums für Wissenschaft, Forschung, Kunst – Baden-Württemberg. Weitere finanzielle Unterstützung kam durch den „GRK 1708: *Molecular Principles of Bacterial Survival Strategies*“ der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

Inhalte der hier aufgeführten Dissertation wurden bereits in wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht (s. Kapitel 9).

PASCAL RATH (Arbeitsgruppe GROND, Universität Tübingen):

- Optimierung der Synthese von 7dSh (**56**)
- NMR-Charakterisierung aller Isomere von 7dSh (**56**)
- Design, Synthese und Aufreinigung der Desoxyheptulosen **63 – 65 & 67 – 69**, sowie chemische Analyse
- NMR-Charakterisierung von 7dGh (**66**)
- Analyse der Konformationen der Verbindungen DAHP (**3**), sowie **63 – 67**
- Interpretation der *in vivo* Untersuchungen am Cyanobakterium *A. variabilis*
- Interpretation der *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen an der Modellpflanze *A. thaliana*
- Design, Synthese und Aufreinigung der Desoxy-Verbindungen ¹³C₅-5-Desoxy-ribose (**58***) und ¹³C₅-7dSh (**56***)
- *In vivo* Inhibierungsstudie an der Modellpflanze *A. thaliana*
- Durchführung und Interpretation der *Molecular Docking*-Studie mit dem *Docking*-Programm FITTED

JOHANNA RAPP (Arbeitsgruppe FORCHHAMMER, Universität Tübingen):

- Idee zur Synthese von 7dGh (**66**), sowie Darstellung, chromatographische Aufreinigung und massenspektrometrische Analyse
- Herstellung und Aufreinigung der DHQS von *A. thaliana* (*AtDHQS*) und *A. variabilis* (*AtDHQS*)

- Bestimmung der inhibitorischen *in vitro* Aktivität der Verbindungen über den IC₅₀-Wert an der isolierten DHQS von *A. thaliana* (*AtDHQS*)
- *In vivo* Inhibierungsstudie am Cyanobakterium *A. variabilis*
- Bestimmung der Zelldichte behandelter *A. variabilis* Zellen über den Chlorophyll *a* Gehalte
- Absorptionsstudie zur Aufnahme der Inhibitoren in die Zellen von *A. variabilis*
- Akkumulation von DAHP (**3**), als biologisches Substrat der DHQS, in mit Inhibitor behandelten *A. variabilis* Zellen
- Interpretation der *in vivo* Untersuchungen am Cyanobakterium *A. variabilis*
- Interpretation der *in vitro* Untersuchungen an der Modellpflanze *A. thaliana*
- Anleiten von PASCAL RATH und MICHAELA SCHUPPE in der Herstellung und Aufreinigung der Transketolase

KLAUS BRILISAUER (Arbeitsgruppe FORCHHAMMER und GROND, Universität Tübingen):

- Erstmaliger Nachweis von 7dSh (**56**) in *A. variabilis*
- Strukturaufklärung von 7dSh (**56**), sowie Etablierung der ersten grundlegenden Synthese von 7dSh (**56**) mittels Transketolase
- Aufstellung der Theorie zum Mode of Action
- Idee zur Synthese von 7dSh – *Prodrug* Derivaten

MARVIN BRAUN (Arbeitsgruppe HARTER, Universität Tübingen)

- Durchführung und Auswertung der intrazellulären Akkumulation von 7dSh (**56**) und 7d7FSh (**63**) in *A. thaliana*

7. Zusammenfassung und Ausblick

Syntheseoptimierung und vollständige NMR-Charakterisierung von 7dSh (56)

- Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chemoenzymatische Synthese von 7dSh (56) durch das Enzym Transketolase, etabliert von KLAUS BRILISAUER, hinsichtlich des Puffersystems, der Hydroxypyruvat-Äquivalente und der Reaktionsdauer optimiert. Durch diese Verbesserungen konnte eine Verdopplung der Ausbeute von 20 auf 40 % erzielt werden, bezogen auf das Edukt 5-Desoxy-ribose (58).
- Zudem wurde das Edukt 5-Desoxy-ribose (58), ausgehend von D-Ribose (70) und basierend auf der Synthese von Capecitabin (76), hergestellt um 7dSh (56) im Gramm-Maßstab kosteneffizienter darzustellen. Mittels dieser Optimierungen konnte über 2 g 7dSh (56) dargestellt werden.
- Für anschließende SAR-Studien wurde eine vollständige NMR-Charakterisierung von allen Isomeren des 7dSh (56) in D₂O durchgeführt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass 7dSh (56) in den drei Isomeren-Verhältnissen 67 % β -Furanose, 18 % α -Pyranose und 15 % α -Furanose vorliegt.

Chemische Derivatisierung und biologische Analyse von 7dSh-Analoga zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehungen

- Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Hybrid-Synthesestrategie zur Darstellung von C₇-Zuckern entwickelt und etabliert. Diese Hybrid-Synthesestrategie kombiniert chemische Totalsynthese mit chemoenzymatischer Synthese, was einen direkten und einfachen Zugang zu vielfältigen und neuen 7dSh-Analoga erlaubt. Anhand dieser Hybrid-Strategie konnten die Derivate 7d7FSh (63), 5,7dd5Flh (64), 7d5MSh (65) und 5,7ddGh (67) dargestellt werden.
- Die Modifikation der literaturbekannten Synthese von 2-Keto-L-gulonsäure (113) über die Oxidation von L-Sorbose (111) ermöglichte die Oxidation von 7dSh (56) an C-1, was zur Darstellung von COOH-7dSh (68) führte.

- Aufgrund der hohen Polarität von 7dSh (**56**) ist ein passiver Import in biologische Zellen erheblich beeinträchtigt, weshalb das *Prodrug*-Design, durch Peracetylierung der Verbindung, angewendet wurde. Dadurch konnte sowohl die Penta- als auch die Hexaacetyl-7dSh (**69**, **114**) dargestellt und aufgereinigt werden.
- Zur Aufklärung der Biosynthese von 7dSh (**56**) wurden erstmals die ¹³C-markierten Verbindungen ¹³C₅-5-Desoxy-ribose (**58***) und ¹³C₅-7dSh (**56***) mittels der hier entwickelten und etablierten Hybrid-Synthesestrategie dargestellt, sowie anschließend aufgereinigt und chemisch-analytisch charakterisiert.
- Die detaillierte Analyse der NMR-Spektren der synthetisierten Verbindungen ermöglichte eine differenzierte Zuordnung der Konformationen der verschiedenen Desoxyheptulosen und derer Isomere. Dies war ein wichtiger Baustein bei der Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung.
- Die Untersuchung der wachstumshemmenden Eigenschaften der 7dSh- und Carbaphosphonat-Analoga gegen *A. variabilis* zeigten, dass lediglich 7dSh (**56**) und 7d7FSh (**63**) biologische *in vivo* Aktivitäten im untersuchten Konzentrationsbereich besitzen. Dies war sowohl visuell als auch über den Chlorophyll *a* Gehalt, welcher der Zelldichte entspricht, erkennbar. Ein möglicher Grund für die fehlende *in vivo* Aktivität der anderen potentiellen DHQS Inhibitoren ist ein fehlender aktiver oder auch inaktiver Zellimport.
- Die Absorptionsstudie zur Aufnahme der Inhibitoren in die Zellen von *A. variabilis* zeigten eine potenziell erfolgreiche Aufnahme von 7dSh (**56**), 7d7FSh (**63**) und 5,7dd5FIh (**64**). Im Falle von 7dSh (**56**) konnte nach 48 h nur noch etwa 60 % der ursprünglich zugegebenen Menge im Medium nachgewiesen werden. Im Falle von 5,7dd5FIh (**64**) waren nach 48 h nur noch etwa 40 % nachweisbar. Nach 24 h war keine der ursprünglich applizierten Menge an 7d7FSh (**63**) mehr im Medium bestimmbar, was auf einen schnellen Import hindeutet. Diese Theorie konnte durch die Akkumulation von DAHP (**3**) in den behandelten Zellen bekräftigt werden, so war die Menge an DAHP (**3**) in mit 7d7FSh (**63**) behandelten Zellen höher als mit 7dSh (**56**) behandelten Zellen.

- Mit der Forschungshypothese, 7dSh (**56**) und dessen Analoga als künftige Herbizide einsetzen zu können wurden die IC₅₀-Werte an der isolierten DHQS aus *A. thaliana* bestimmt. Ausschließlich 7d5MSh (**65**) und Sedoheptulose (**23**) zeigten keine inhibierende Wirkung gegen die DHQS. Im Falle der Carbaphosphonat-Analoga **C2** – **C4** (**115** – **117**) konnten trotz der *Prodrug*-Funktionalitäten inhibitorische Eigenschaften festgestellt werden. Die Verbindungen 7dSh (**56**), 7d7FSh (**63**), 5,7dd5Fh (**64**) und 5,7ddGh (**67**) zeigten alle *in vitro* Aktivität am Enzym in einem engen Konzentrationsbereich. Diese Ergebnisse bestätigten, dass das Vorhandensein der Hydroxylgruppe an C-5 und das Vorliegen der Verbindung in der Pyranose-Form gleichwertige Antagonisten sind. Mit Hilfe der NMR bestimmten Konformationen und des Reaktionsmechanismus der DHQS-Reaktion, konnte eine Hypothese zu den erhaltenen IC₅₀-Werten und der damit einhergehenden Struktur-Wirkungs-Beziehung postuliert werden.
- *In planta* Analyse der wachstumshemmenden Eigenschaften der 7dSh- und Carbaphosphonat-Analoga an *A. thaliana* bestätigten 7dSh (**56**), 7d7FSh (**63**) und 5,7ddGh (**67**) als wirksame Inhibitoren. Darüber hinaus konnte für die *Prodrug*-Carbaphosphonat-Derivate **C2** (**115**) und **C4** (**117**) eine *in planta* Aktivität gemessen werden, was die möglichen Vorteile des *Prodrug*-Konzepts bestätigt.
- Mit einer *Molecular Docking*-Studie mit der Software FITTED wurden verschiedene Verbindungen *in silico* an das aktive Zentrum der DHQS gedockt und die freien Energien bestimmt. Die freie Energie beschreibt dabei, wie gut die Verbindung im aktiven Zentrum stabilisiert wird. Im Falle der Carbaphosphonate konnte die FITTED-Software die Verbindungen plausibel in das aktive Zentrum docken. Die Klasse der 7dSh-Verbindungen konnte jedoch nicht zuverlässig gedockt werden, was höchstwahrscheinlich auf die fehlende Phosphat- oder Phosphonat-Gruppe zurückzuführen ist. Diese Gruppe wird von der Software sowohl für eine klare Ligandenausrichtung als auch für eine gute Enzym-Inhibitor-Interaktion als notwendig erachtet. Im Falle der Desoxyheptulosen wird die Summe schwächerer Wechselwirkungen für die Stabilisierung im aktiven Zentrum entscheidend sein.

Ausblick

- Auf synthetischer Seite und basierend auf den Ergebnissen der SAR-Studie bietet das 7dSh-Projekt eine Vielzahl an potenziell interessanten Derivaten. So könnte eine 7-Desoxy-5-keto-sedoheptulose (**133a-c**) dargestellt werden, die möglicherweise analog zum 5-Keto-carbaphosphonat (**121**), ein irreversibler Inhibitor wäre.^[111] Diese Verbindung wäre nicht in der Lage die Furanose-Form auszubilden und hätte zusätzlich die Fähigkeit, alle Wechselwirkungen innerhalb des aktiven Zentrums, analog 7dSh (**56**), einzugehen. Ein Syntheseentwurf wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt (Abb. 52) und fußt auf der entwickelten Synthesestrategie B, mit zusätzlichen Synthesemodifikationen, wie einer Oxidation der acetonidgeschützten 5-Desoxy-Verbindung **130** mit Pyridiniumdichromat (PDC). Ein mögliches Problem dieser Verbindung ist jedoch, dass sie sowohl über die Ketogruppe an C-2 (**133b**) als auch an C-5 (**133c**) einen Ringschluss ausbilden könnte, was zu unterschiedlichen dreidimensionalen Strukturen führen würde. Über welche Gruppe der Ringschluss schlussendlich stattfindet, kann hier nicht mit plausiblen Hypothesen postuliert werden.

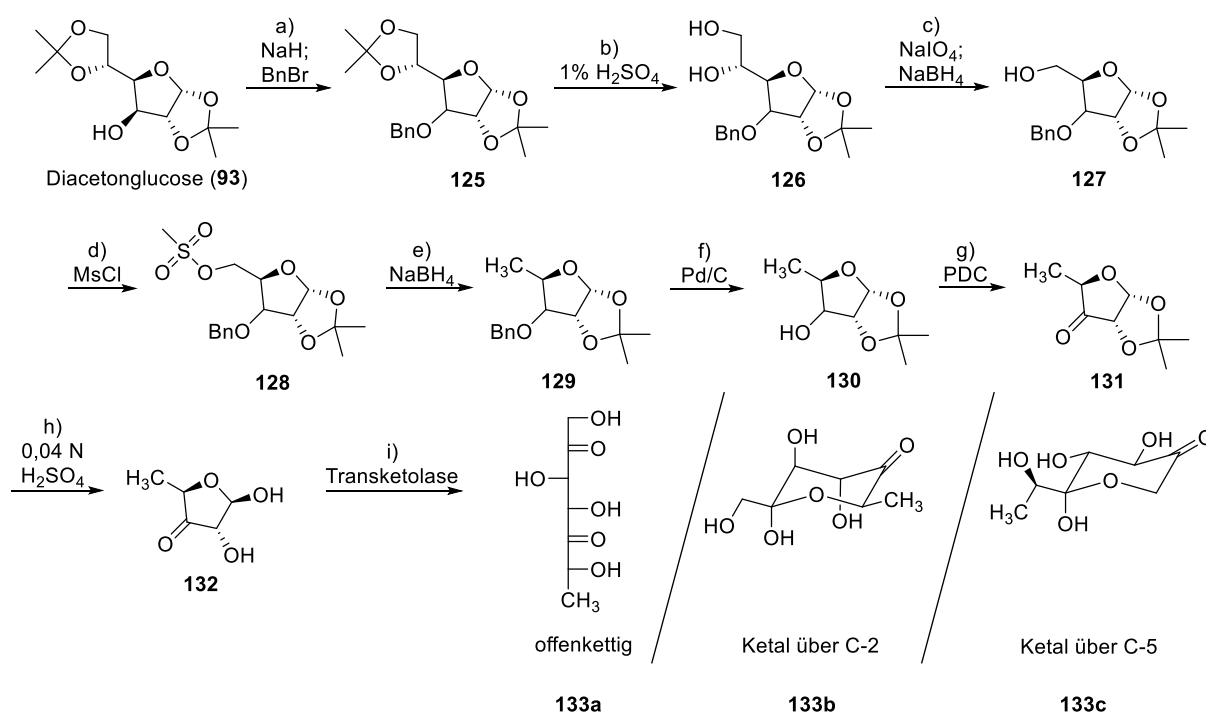


Abbildung 52: Synthesekonzept zur Darstellung von 7-Desoxy-5-keto-sedoheptulose (**133a-c**) über neun Stufen, ausgehend von Diacetonglucose (**93**).

- Ein weiterer Forschungsansatz wären Metabolom-Studien, in denen mit 7dSh (**56**) behandelte Zellen mit unbehandelte Zellen verglichen werden. Diese Untersuchung könnte Aufschluss darüber geben, ob 7dSh (**56**) neben der DHQS über weitere Wirkmechanismen verfügt. Auf Grundlage der derzeitigen Daten ist ein zusätzlicher Wirkmechanismus durchaus möglich.
- Ein entscheidender Faktor für die Marktreife von 7dSh (**56**) sind die Synthesekosten, welche beispielsweise im Vergleich zu Glyphosat, trotz der Optimierungen im Rahmen dieser Arbeiten, vielfach höher ausfallen. Hieraus ableitbar ist die weitere Kostenreduktion, beispielsweise über die Verbesserung der 7dSh (**56**) - Produktion der Produzentenstämme *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Cyanobakterium) oder *Streptomyces setonensis* (Streptomycet).

8. Summary and Outlook

Synthetic optimization and full NMR characterization of 7dSh

- In this work, the chemoenzymatic synthesis of 7dSh (**56**) by the enzyme transketolase, established by KLAUS BRILISAUER, was optimized based on the buffer system, the hydroxypyruvic acid equivalents and the reaction time. These improvements resulted in a duplication of the yield from 20 % to 40 %, based on 5-deoxy-ribose (**58**) as educt.
- Additionally, the educt 5-deoxy-ribose (**58**) was synthesized starting from D-ribose (**70**), based on the synthesis of capecitabin (**76**), to produce 7dSh (**56**) cost-efficient in gram-amounts.
- For further SAR-studies, a full NMR characterization of 7dSh (**56**) with all isomers in D₂O was performed. This analysis verified, that 7dSh (**56**) exists in three different isomers with the following distribution: 67 % β -Furanose, 18 % α -Pyranose and 15 % α -Furanose.

Chemical derivatization and biological analysis of 7dSh-analogs to develop a structure activity relationship

- Within this work, a new hybrid synthetic approach for the synthesis of C₇-sugars were developed and established. This hybrid synthetic approach combines total chemical and chemoenzymatic synthesis and provide direct and straightforward access to versatile and new 7dSh-analogs. Through this hybrid approach, the following derivatives were synthesized: 7d7FSh (**63**), 5,7dd5FIh (**64**), 7d5MSh (**65**) and 5,7ddGh (**67**).
- The Modification of the literature synthesis of 2-Keto-L-gulonic acid (**113**) by oxidation of L-Sorbose (**111**) allowed the oxidation of 7dSh (**56**) at C-1, leading to the preparation of the new 7dSh-analog COOH-7dSh (**68**).

- Based on the high polarity of 7dSh (**56**) a passive import into living cells is significantly impaired. Because on this fact, the prodrug-design was used through peracetylation of the compound as the first prodrug derivative. Subsequently, both the penta- and the hexaacetylated-7dSh derivatives **69** and **114** were synthesized and purified.
- To clarify the biosynthesis of 7dSh (**56**) the ^{13}C -labelled compounds $^{13}\text{C}_5$ -5-Deoxy-ribose (**58***) and $^{13}\text{C}_5$ -7dSh (**56***) were synthesized for the first time, based on the here developed and established hybrid synthetic approach, as well as purified and chemically characterized.
- The precise analysis of the NMR-spectra of the synthesized compounds permitted to identify the conformations of the different deoxyheptuloses with the respective isomers. This was a vital component in the deployment of a structure-activity-relationship.
- Investigation of growth inhibitory properties of the 7dSh- and Carbaphosphonate-analogs against *A. variabilis* demonstrated, that only 7dSh (**56**) and 7d7FSh (**63**) had a biological activity in the measured concentration range. This was evident in visual appearance and the content of chlorophyll *a*, which corresponds to cell density. A possible reason for the missing *in vivo* activity of the other potential DHQS inhibitors is a missing active or inactive cell import.
- The uptake study regarding the import of the inhibitors into the cells of *A. variabilis* revealed a potentially successful uptake of 7dSh (**56**), 7d7FSh (**63**) and 5,7dd5FIh (**64**). In case of 7dSh (**56**), only around 60 % of the initially applied amount were detectable in the supernatant after 48 hours. In case of 5,7dd5FIh (**64**), only 40 % were detectable after this time. After 24 hours none of the initially applied 7d7FSh (**63**) were detectable in the supernatant, indicating a rapid import. This theory was confirmed by measuring the accumulation of DAHP (**3**) in the treated cells. In case of 7d7FSh (**64**), an even higher amount of DAHP (**3**) was detected, compared to 7dSh (**56**).

- With the research hypothesis of using 7dSh (**56**) and its analogs as future herbicides, IC₅₀-values against the DHQS of *A. thaliana* were determined. Only 7d5MSh (**65**) and Sedoheptulose (**23**) showed no inhibitory activity against the DHQS. Despite the prodrug structures of the carbaphosphonates **C2** - **C4** (**115** – **117**), inhibitory effects could be measured. The compounds 7dSh (**56**), 7d7FSh (**63**), 5,7dd5Flh (**64**) and 5,7ddGh (**67**), all showed activity against the isolated enzyme in a narrow range. These data confirm that the amount of pyranose form and the presence of the hydroxyl group at C-5, are equal antagonists. The NMR-determined conformations and the reaction mechanism were used to postulate a theory of the measured IC₅₀-values and as a consequence the structure-activity-relationship.
- Analysis of *in planta* inhibitory potency of the 7dSh- and Carbaphosphonate-analogs revealed 7dSh (**56**), 7d7FSh (**63**) and 5,7ddGh (**67**) as inhibitors. Additionally, *in planta* activity was measured for the prodrug carbaphosphonate derivatives **C2** (**115**) and **C4** (**117**), confirming the possible benefits of the prodrug concept.
- Based on a molecular docking study with the software FITTED, different compounds were docked *in silico* into the active site of the DHQS to determine the free energy. The free energy describes the stabilization of the compound in the active site. In case of the carbaphosphonates, the FITTED software appropriately docked the compounds into the active site. However, the 7dSh-class could not be docked reliably, which is most probably caused by the missing phosphate or phosphonate group. The software considered the group to be necessary for a clear alignment of the ligand and for a good enzyme-inhibitor-interaction. In case of the deoxyheptuloses the sum of weaker interactions will be crucial for the stabilization in the active site.

Outlook

- On the synthetic side and based on SAR-study results, the 7dSh-project provides a variety of potentially interesting derivatives. One example is 7-Deoxy-5-oxo-sedoheptulose (**133a-c**), which could be an irreversible inhibitor, analogous to 5-Keto-carbaphosphonate (**121**).^[111] This compound would not be able to form the furanose structure and at the same time, had the ability to develop all interactions within the active site like 7dSh (**56**). Within the frame of this work, a synthetic draft was prepared (Figure 52) and is based on the self-developed Synthesis-Strategy B, with additional synthetic modifications, like an oxidation of the acetonid-protected 5-deoxy-compound **130** with PDC. One potential problem with this compound is the ability to form a ring closure with both ketone groups at C-2 (**133b**) and at C-5 (**133c**), resulting in different 3D structures. Clearly postulating a feasible hypothesis, which of the two ketone groups would form the ring closure is not possible.
- Another research approach could be metabolome studies comparing cells treated and untreated with 7dSh (**56**). This investigation could provide information on whether 7dSh (**56**) has additional mode of actions besides the DHQS. Based on current data, an additional mode of action is certainly possible.
- A key factor for the marketability of 7dSh (**56**) is the synthetic costs. Despite the synthetic optimizations within the frame of this work, the synthetic costs of 7dSh (**56**) are frequently higher compared to glyphosate. Therefore, a further reduction of this costs, for example through improvement of the 7dSh (**56**) production of the producer strains *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Cyanobakterium) or *Streptomyces setonensis* (Streptomycet) is a possible idea.

9. Veröffentlichte Publikationen

- K. Brilisauer, J. Rapp, P. Rath, A. Schöllhorn, L. Bleul, E. Weiß, M. Stahl, S. Grond, K. Forchhammer: Cyanobacterial antimetabolite 7-deoxy-sedoheptulose blocks the shikimate pathway to inhibit the growth of prototrophic organisms. *Nat. Commun.* 2019, 10, 545.
- J. Rapp, P. Rath, J. Kilian, K. Brilisauer, S. Grond, K. Forchhammer: A bioactive molecule made by unusual salvage of radical SAM enzyme byproduct 5-deoxyadenosine blurs the boundary of primary and secondary metabolism. *J. Biol. Chem.* 2021, 296, 100621.
- P. Rath, J. Rapp, K. Brilisauer, M. Braun, Ü. Kolukisaoglu, K. Forchhammer, S. Grond: Hybrid Chemoenzymatic Synthesis of C7-Sugars for Molecular Evidence of in vivo Shikimate Pathway Inhibition. *ChemBioChem.* 2022, 23, e202200241.
- Unterstützende Arbeiten zum Patent: WO 2019/101937 A2/A3. Erfinder: S. Grond, K. Forchhammer, K. Brilisauer. Antragsteller: Eberhard Karls Universität Tübingen. Titel: Novel Inhibitors of the Shikimate Pathway

B. Experimenteller Teil

10. Allgemeines

10.1 Chemikalien

Lösungsmittel

Für Reaktionen wurde Lösungsmittel mit der Reinheit p.a.- oder HPLC-Grade verwendet. Wurden Reaktionen unter Schutzgas nach der Schlenk-Technik durchgeführt, so wurden durchweg absolutierte Lösungsmittel verwendet. Für HPLC-Aufreinigungen wurden Lösungsmittel in HPLC-Grade (beispielsweise Firma FISHER SCIENTIFIC (Methanol) verwendet. Wasser wurde aus einer Reinstwasseranlage (MILLIPORE MILLI-Q REFERENCE A+) verwendet. Für LC-HRMS-Analysen wurden ausschließlich LC-MS-Grade Lösungsmittel verwendet. Methanol wurde beispielsweise von der Firma TH. GEYER bezogen, Wasser und Ameisensäure von der Firma FLUKA.

Chemikalien zur Synthese

Chemikalien, die zur Synthese verwendet wurden und kommerziell erhältlich waren, wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die angegebenen Reinheiten wurden zur Berechnung der Ansätze mit einbezogen.

Dünnschichtchromatographie

Normalphase: MERCK DC-Alufolien 60 F₂₅₄, Schichtdicke: 0,2 mm

Anfärbereagenz

Anisaldehyd-Anfärbelösung:

1 mL Anisaldehyd in 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure.

10.2 Instrumentelle Analytik

HPLC-HR-ESI-qTOF-MS

UltiMate 3000 HPLC von THERMO SCIENTIFIC gekoppelt an MaXis 4G von BRUKER DALTONICS.

UltiMate 3000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) Pumpe: binäre Hochdruckgradientenpumpe; Autosampler: 4 °C; Säulenofen: 40 °C; Säule: Nucleoshell 2,7 µm 150 x 2 mm (MACHEREY NAGEL); HPLC Programm: Gradient 10 % auf 100 % Laufmittel B in 20 min., Laufmittel: A: Wasser (0,1 % Ameisensäure), B: Methanol (0,06 % Ameisensäure); Flussrate: 0,3 mL/min.

MaXis 4G (HR-ESI-qTOF-Massenspektrometer, BRUKER DALTONICS) Nebulizer Druck: 0,4 bar; Dry-Gas: Fluss: 4,0 L/min; Temperatur: 200 °C; Messbereich: 50 – 1250 m/z; Kalibrant: Natriumformiat; Kalibriermodus: HPC; Positiv- und Negativ-Modus; Endplatten Offset: 500 V; Kapillarspannung: 3000 V

Analytische oder semipräparative HPLC

1260 Infinity (AGILENT)

Pumpe: 1260 Binary Pump; Detektor: 1260 DAD WR; Autosampler mit 100 µL Auftragsschleife; 1260 Vialsampler; Fraktionssammler: 1260 A-FC; Säulenofen: 1290 MCT; Software: Open LAB CDC, Chem Station Edition (Agilent Technologies).

Präparative HPLC

UltiMate 3000 (THERMO SCIENTIFIC)

Pumpe: HPG 3200 BX-Pumpe; DAD-Detektor: DAD-3000RS; Messzelle: semipräparativ; Solvent Rack: SR-3000; Fraktionssammler: UltiMate 3000 AFC-3000; Entgaser: Knauer; Software: Chromeleon® Version 6.80.

Säulen:

Kromasil 100 C₁₈; Partikelgröße: 5 µm; Säulengröße: 250 x 4 mm; Firma: DR. MAISCH - Analytisch

Hi-Plex Ca; Partikelgröße: 8 µm; Säulengröße 300 x 10,7 mm; FIRMA: AGILENT - Semipräparativ

Kromasil 100 C₁₈; Partikelgröße: 7 µm; Säulengröße: 250 x 20 mm; Firma: DR. MAISCH - Präparativ

NMR

¹H-NMR-Spektren: BRUKER Avance III HD 400 (400 MHz), BRUKER Avance III HDX 600 (600 MHz), BRUKER Avance III HDX 700 (700 MHz); 5 mm Probenröhrchen.

¹³C-NMR-Spektren: Bruker Avance III HD 400 (100,6 MHz), BRUKER Avance III HDX 600 (150 MHz), BRUKER Avance III HDX 700 (176 MHz); 5 mm Probenröhrchen.

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett von Dublett, dm = Dublett von Multiplett, qm = Quartett von Multiplett, ddd = Dublett von Dublett von Duplett, ddm = Duplett von Duplett von Multiplett, dq = Dublett von Quartett, dddd = Dublett von Dublett von Dublett von Dublett, ddq = Dublett von Dublett von Quartett, dqm = Dublett von Quartett von Multiplett

MPLC

VARIAN IntelliFlash, Software: Varian 971-FP Version 3.1.524. Vorgepackte Säulen mit unterschiedlichen Größen von AGILENT und MACHEREY NAGEL.

10.3 Sonstige Geräte

Tischzentrifuge EPPENDORF Typ 5415D, UV-Lampe SCHÜTT LABORTECHNIK, Ultraschallbad QUALILAB, Gefriertrocknung CHRIST Beta 2-8 LD Plus mit VACUUBRAND Hybridpumpe RC6.

11. Biologische Arbeiten

Analyse des Keimling-Wachstums von *A. thaliana*

Die Auskeimung der *A. thaliana* Keimlinge wurde auf halbkonzentrierten Agarplatten (1,5 % w/v, Bacto agar) mit Murashige-Skoog-Medium (MS, DUCHEFA BIOCHEMIE) durchgeführt. Die zu testenden Verbindungen wurden mit dem noch lauwarmeren Agar in einem Falcon-Tube gemischt und anschließend zum Aushärten in eine Petrischale überführt. Für ein simultanes Wachstum der Keimlinge wurden die Samen vor der Auskeimung für zwei Tage bei 4 °C gelagert. Die Samen wurden in jeweils zwei Reihen auf den Agar gelegt. Für ein vertikales Wachstum der Pflanzen wurden die Agarplatten vertikal in der Lichtkammer aufgestellt. Die Wachstumsbedingungen waren konstante Beleuchtung bei 22 °C für sieben Tage. Die Würzellängen wurden über die Software FIJI bestimmt. Als statistische Analyse wurde ein ungepaarter t-Test mit der Software GRAPHPAD durchgeführt.

Überexpression und Aufreinigung des Enzyms Transketolase

Grundlage der Überexpression der Transketolase war ein zuvor im Arbeitskreis von Professor FORCHHAMMER erstellter, transgener *E. coli* BL21 (DE3) Klon. Dieser trug einen Überexpressionsvektor, der unter anderem für die Transketolase von *Synechococcus elongatus* PCC 7942 codierte. Auf dem Überexpressionsvektor war ebenfalls ein Selektionsmarker mit einer Ampicillinresistenz enthalten. Zellen des transgenen *E. coli* BL21 (DE3) wurden aus einer Kryokultur entnommen und auf einer LB^{Amp}-Agarplatte (50 µg/mL Ampicillin) vereinzelt. Aus einer Einzelkolonie dieses Ausstrichs wurde eine 5 mL Vorkultur in LB^{Amp}-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die aus der Vorkultur erstellte Hauptkultur bestand aus 2 x 500 mL LB^{Amp}, die jeweils in einem 2 L Schüttelkolben mit Schikane kultiviert wurden. Nach Erreichen einer OD von 0,5-0,7 wurde die Überexpression der Transketolase durch Zugabe von 500 µM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert und über Nacht kultiviert. Die Kulturen wurden zentrifugiert (4 °C, 6000 x g, 10 min) und das Pellet in 10 mL Lysepuffer aufgenommen (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,5, Proteaseinhibitor, DNase). Anschließend wurden die Zellen mittels Sonifikation aufgeschlossen und durch Zentrifugation Zellbestandteile und andere unlösliche Bestandteile entfernt (25 min, 35000 x g, 4 °C). Das Zelllysate wurde sterilfiltriert, in 15 mL Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) verdünnt auf eine HISTRAP HP-Säule aufgetragen. Die beladene Säule wurde mit Waschpuffer gewaschen. Die darauffolgende Elution mit Elutionspuffer 1 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol) und anschließend Elutionspuffer 2 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol) führte zum Erhalt des sauberen Enzyms. Die Transketolase enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und in Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT (Dithiothreitol), 0,5 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), 50 % Glycerol, pH 8) über Nacht bei 4 °C dialysiert. Anschließend Lagerung bei -20 °C.

Nicht eigens durchgeführte biologische Untersuchungen

Die biologischen Untersuchungen, welche nicht selbst durchgeführt wurden (Teile von Kapitel 4) sind den jeweilig angeführten Literaturstellen zu entnehmen. Die *in vivo* Inhibierungsstudie an *A. variabilis*, sowie die DAHP Akkumulation an *A. variabilis* basieren auf der Publikation von BRILISAUER *et al.*^[66] Die Bestimmung der IC₅₀-Werte am isolierten *A. thaliana* Enzym basieren auf der Publikation von RAPP *et al.*^[93] Die Bestimmung der Zelldichte über den Chlorophyll *a* Gehalt an *A. variabilis*, sowie die Absorptionsstudie sind der Publikation von RATH *et al.* zu entnehmen.^[106]

12. Molecular Docking Arbeiten

Die *Molecular Docking*-Studie am Enzym DHQS wurde mit der Kristallstruktur PDB: 1XAJ durchgeführt. Es handelt sich hierbei um die Kristallstruktur der DHQS von *Staphylococcus aureus* mit den enthaltenen Liganden Zn²⁺, NAD⁺ und Carbaphosphonat **C1 (10)**. Als *Docking*-Programm wurde die Software FITTED verwenden (Version: 6026; Teil der FORECASTER Plattform). Für jede Struktur wurde ein *semi-flexibel Docking* unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Visualisierung der Ergebnisse wurde mittels der Software PYMOL 2.5.2 (SCHRODINGER, LLC) erstellt.

13. Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Methyl- und Acetonidschützung^[76]

Die zu schützende Verbindung wurde in einem 4:1-Gemisch aus Aceton und Methanol mit $\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (1 Äq.) im Beisein katalytischer Mengen konz. H_2SO_4 für 20 h bei 45 °C gerührt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurde ein weißer Niederschlag abfiltriert und mit demselben 4:1-Gemisch nachgewaschen. Anschließend wurde die Lösung mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung neutralisiert. Der hierbei ausfallende weiße Niederschlag wurde erneut abfiltriert und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die restliche wässrige Lösung wurde drei Mal mit Ethylacetat extrahiert, der Extrakt über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend bis zur Trockne eingengt.

AAV2: Einführung einer Mesylschutzgruppe^[77]

Der zu schützende Zucker wurde in DCM gelöst und mit TEA (2,5 Äq.) versetzt. Nach abkühlen der Lösung mittels eines Eis-Bades wurde Methansulfonsäurechlorid (2,5 Äq.) langsam (5-10 min) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde daraufhin 5 h bei ca. 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung wie folgt gewaschen: 1 M HCl, Reinstwasser, gesättigte NaHCO_3 -Lösung, gesättigte NaCl-Lösung, Reinstwasser. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt.

AAV3: Reduktion der mesylgeschützten Hydroxylgruppe an C-5^[76]

Der mesylgeschützte Zucker wurde in DMSO gelöst und die Lösung mittels Eis-Bad herabgekühlt. NaBH_4 (5 Äq.) wurde langsam unter Rühren der Reaktionslösung zugegeben. Nachfolgend wurde die Temperatur langsam auf 85 °C erhöht und für 12 h gehalten. Anschließend wurde die Reaktionslösung mittels Eis-Bad heruntergekühlt und das noch vorhandene NaBH_4 mit 5 %iger wässriger Essigsäurelösung gequenchet. Die wässrige Lösung wurde drei Mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss drei Mal mit Reinstwasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne eingengt. Hierbei wurde ein Vakuum von 750 mbar bei 40 °C nicht unterschritten.

AAV4: Selektive Abspaltung der Acetonidschutzgruppe^[83]

Die zu entschützende Verbindung wurde in ca. 45 mL Methanol gelöst und mittels eines Eis-Bades herabgekühlt. Anschließend wurde dieselbe Menge einer 1 %igen H_2SO_4 -Lösung langsam zugegeben. Die Kühlung wurde nach 30 min entfernt und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Neutralisation mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zur Entfernung der ausfallenden Salze wurde das Reaktionsgemisch in Methanol aufgenommen, abfiltriert und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt.

AAV5: Oxidative Diolsplaltung mittels NaIO_4 und anschließende Reduktion mit NaBH_4 ^[83]

Das Diol wurde in ca. 40 mL eines 2:1-Gemisches aus Dioxan und Reinstwasser gelöst. NaIO_4 (1,2 Äq) wurde portionsweise zugegeben und das Reaktionsgemisch 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ca. 25 mL Ethanol beendet. Nach 30 min rühren, wurde ein weißer Feststoff abfiltriert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit NaBH_4 (1 Äq) versetzt und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Neutralisation mit Essigsäure beendet, zentrifugiert und der Überstand zur Trockne eingengt.

AAV6: Entschützung zum Erhalt der freien Pentose^[76]

Die zu entschützende Verbindung wurde in 0,04 N H_2SO_4 -Lösung gelöst und 3 h bei 85 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt, mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung neutralisiert und mittels Lyophilisation getrocknet. Die schlussendliche Aufreinigung erfolgte über MPLC.

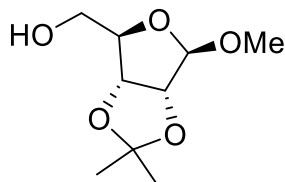
AAV7: Chemoenzymatische Synthese mittels Transketolase

TPP (2 mM) und $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (3 mM) wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß in ca. 0,8 mL Reinstwasser vorgelöst und auf einen pH-Wert von ca. 7,0 eingestellt. Anschließend wurde der Aldehyd (1 Äq), sowie K-HPA (2 Äq) zugegeben. Im nachfolgenden wurde der pH-Wert erneut auf 7,0 eingestellt, mit Reinstwasser auf 1,5 mL aufgefüllt und die Transketolase (20 μL Kryostock in Glycerin (6,5 mg/mL)) zugegeben. Das Gemisch wurde in einem Schüttler bei 30 °C und 400 rpm für 7 Tage durchmischt, wobei ca. alle 24 h der pH-Wert auf 7,0 korrigiert wurde, sowie 0,25-0,5 Äq K-HPA zugegeben wurden. Die Reaktion wurde mittels Lyophilisation beendet, das Enzym mit ca. 15 mL Methanol gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt. Anschließend wurde das Methanol im Vakuum entfernt. Die schlussendliche Aufreinigung erfolgte mittels MPLC, sowie HPLC.

14. Spezielle Arbeitsvorschriften

14.1 Darstellung von 7dSh (56)

Synthese: Methyl-2,3-O-isopropyliden-β-D-ribofuranosid (71)



Es wurden 14,8 g (97,5 mmol, 1 Äq) D-Ribose (**70**) in 375 mL Aceton/Methanol-Gemisch gemäß AAV1 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (14,9 g, 73,0 mmol, 75 %). Durchgeführt im Rahmen eines Modulpraktikums durch TAULANT DEMA.

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,58 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

$C_9H_{16}O_5$ (204,22 g/mol)

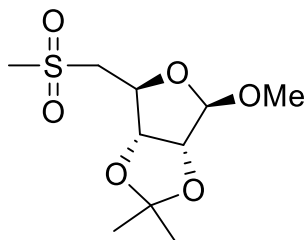
HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 205,1071$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 205,1073$ (error = -1,1 ppm, mean error = -0,9 ppm, mSigma = 5,3)

$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 227,0890$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 227,0894$ (error = -1,8 ppm, mean error = -2,1 ppm, mSigma = 1,7)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=4,89 (s, 1H, 1-H); 4,73 (d, $J_{3,2}=6,0$ Hz, 1H, 3-H); 4,50 (d, $J_{2,3}=6,0$ Hz, 1H, 2-H); 4,32 (dd, $J_{4,5b}=3,8$ Hz, $J_{4,5a}=3,0$ Hz, 1H, 4-H); 3,59 (dd, $J_{5a,5b}=12,4$ Hz, $J_{5a,4}=3,0$ Hz, 1H, 5a-H); 3,53 (dd, $J_{5b,5a}=12,4$ Hz, $J_{5b,4}=3,8$ Hz, 1H, 5b-H); 3,34 (s, 3H, OCH_3); 1,40 und 1,24 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=112,1 ($C(CH_3)_2$); 109,8 (C-1); 88,2 (C-4); 85,7 (C-2); 81,5 (C-3); 63,9 (C-5); 55,4 (OCH_3); 26,3 und 24,7 ($C(CH_3)_2$).

Synthese: Methyl-2,3-O-isopropyliden-5-O-mesyl-β-D-ribofuranoid (72)



Es wurden 14,9 g (72,9 mmol, 1 Äq) **71** in 180 mL DCM gemäß AAV2 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein gelbes Öl erhalten, welches in der Kälte auskristallisierte (19,7 g, 69,8 mmol, 96 %). Durchgeführt im Rahmen eines Modulpraktikums durch TAULANT DEMA.

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,62 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

$C_{10}H_{18}O_7S$ (282,31 g/mol)

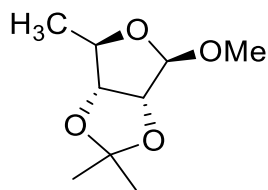
HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 283,0846$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 283,0846$ (error = -0,2 ppm, mean error = 1,4 ppm, mSigma = 10,1)

$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 305,0665$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 305,0664$ (error = 0,4 ppm, mean error = 1,1 ppm, mSigma = 6,8)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=4,98 (s, 1H, 1-H); 4,69 (dd, $J_{3,2}=5,9$ Hz, $J=0,7$ Hz, 1H, 3-H); 4,59 (d, $J_{2,3}=5,9$ Hz, 1H, 2-H); 4,40 (m, 1H, 4-H); 4,20 (s, 1H, 5a-H); 4,18 (d, $J=1,6$ Hz, 1H, 5b-H); 3,33 (s, 3H, OCH_3); 3,05 (s, 3H, Mesyl- CH_3); 1,47 und 1,31 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=112,9 ($C(CH_3)_2$); 109,7 (C-1); 85,0 (C-2); 83,9 (C-4); 81,5 (C-3); 68,6 (C-5); 55,4 (OCH_3); 37,9 (Mesyl- CH_3); 26,5 und 25,0 ($C(CH_3)_2$).

Synthese: Methyl-2,3-*O*-isopropyliden-5-desoxy- β -D-ribofuranoid (73)



Es wurden 9,59 g (34,0 mmol, 1 Äq) **72** in 50 mL DMSO gemäß AAV3 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (5,52 g, 29,3 mmol, 86 %). Durchgeführt im Rahmen eines Modulpraktikums durch TAULANT DEMA.

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,91 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

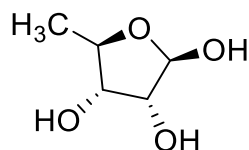
$C_9H_{16}O_4$ (188,22 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 211,0941$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 211,0947$ (error = -3,1 ppm, mean error = -3,5 ppm, mSigma = 1,4)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=4,88 (s, 1H, 1-H); 4,59 (d, $J_{2,3}=5,9$ Hz, 1H, 2-H); 4,46 (d, $J_{3,2}=5,9$ Hz, 1H, 3-H); 4,29 (q, $J_{4,5}=7,1$ Hz, 1H, 4-H); 3,28 (s, 3H, OCH_3); 1,42 und 1,26 (s, 3H, $C(CH_3)_2$); 1,24 (d, $J_{5,4}=7,1$ Hz, 3H, 5-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=112,2 ($C(CH_3)_2$); 109,5 (C-1); 85,9 (C-2); 85,3 (C-3); 83,2 (C-4); 54,4 (OCH_3); 26,5 und 25,0 ($C(CH_3)_2$); 21,0 (C-5).

Synthese: 5-Desoxy-D-ribofuranose (58)



Es wurden 5,39 g (28,6 mmol, 1 Äq) **73** in 5,4 mL 0,04 N H₂SO₄-Lösung gemäß AAV6 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (7:3). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (3,00 g, 22,4 mmol, 78 %). Durchgeführt im Rahmen eines Modulpraktikums durch TAULANT DEMA.

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,48 (Chloroform/Methanol (8:2), Anisaldehyd)

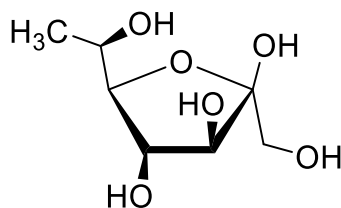
C₅H₁₀O₄ (134,13 g/mol)

HRMS (ESI): [M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 157,0471; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 157,0471 (error = 0,1 ppm, mean error = 0,2 ppm, mSigma = 1,5)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=5,21 (d, *J*=1,8 Hz, 1H, 1-H); 4,06-3,97 (m, 3H, 2-H, 3-H, 4-H); 1,35 (d, *J*=6,1 Hz, 3H, 5-H). α-Anomer: δ(ppm)=5,37 (d, *J*_{1,2}=4,3 Hz, 1H, 1-H); 4,16 (dm, *J*_{2,1}=4,3 Hz, 1H, 2-H); 4,15 (qm, *J*_{4,5}=6,4 Hz, 1H, 4-H); 3,83 (m, 1H, 3-H); 1,26 (d, *J*_{5,4}=6,4 Hz, 3H, 5-H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=100,8 (C-1); 78,2 (C-4); 75,5 (C-2); 75,2 (C-3); 19,1 (C-5). α-Anomer: δ(ppm)=95,8 (C-1); 78,1 (C-4); 74,9 (C-3); 70,4 (C-2); 17,9 (C-5).

Synthese: 7-Desoxy-sedoheptulose (7dSh, 56)



Es wurden 50,0 mg (373 μ mol, 1 \AA q) **58** gemäß AAV7 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (6:4). Die Schlussendliche HPLC-Aufreinigung erfolgte unter folgenden Bedingungen: Säule Semi-präparative Hi-Plex Ca; Säulentemperatur 85 °C; Fluss 1,0 mL/min. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (28,7 mg, 148 μ mol, 40 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,56 (Chloroform/Methanol (8:5), Anisaldehyd)

$C_7H_{14}O_6$ (194,18 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 217,0683$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 217,0683$ (error = -0,3 ppm, mean error = -0,5 ppm, mSigma = 0,9)

1H -NMR (600 MHz, D_2O) β -Furanose: δ (ppm)=4,23 (dd, $J_{4,3}=7,9$ Hz, $J_{4,5}=7,4$ Hz, 1H, 4-H); 4,09 (d, $J_{3,4}=7,9$ Hz, 1H, 3-H); 3,96 (dq, $J_{6,5}=4,4$ Hz, $J_{6,7}=6,5$ Hz, 1H, 6-H); 3,71 (dd, $J_{5,4}=7,4$ Hz, $J_{5,6}=4,4$ Hz, 1H, 5-H); 3,60 (d, $J_{1a,1b}=12,2$ Hz, 1H, 1a-H); 3,55 (d, $J_{1b,1a}=12,2$ Hz, 1H, 1b-H); 1,22 (d, $J_{7,6}=6,5$ Hz, 3H, 7-H).

α -Pyranose: δ (ppm)=4,09 (m, 1H, 6-H); 4,04 (m, 1H, 4-H); 3,95 (m, 1H, 3-H); 3,68 (d, $J_{1a,1b}=11,6$ Hz, 1H, 1a-H); 3,60 (m, 1H, 5-H); 3,42 (d, $J_{1b,1a}=11,6$ Hz, 1H, 1b-H); 1,28 (d, $J=6,3$ Hz, 3H, 7-H).

α -Furanose: δ (ppm)=4,13 (dd, $J_{4,3}=4,3$ Hz, $J_{4,5}=6,2$ Hz, 1H, 4-H); 4,08 (m, 1H, 3-H); 4,01 (dq, $J_{6,7}=6,6$ Hz, $J_{6,5}=4,0$ Hz, 1H, 6-H); 3,93 (dd, $J_{5,4}=6,2$ Hz, $J_{5,6}=4,0$ Hz, 1H, 5-H); 3,68 (d, $J_{1a,1b}=11,9$ Hz, 1H, 1a-H); 3,65 (d, $J_{1b,1a}=11,9$ Hz, 1H, 1b-H); 1,23 (d, $J_{7,6}=6,6$ Hz, 3H, 7-H).

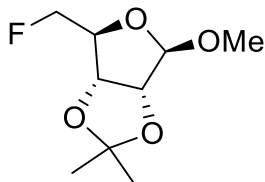
^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O) β -Furanose: δ (ppm)=101,3 (C-2); 83,6 (C-5); 75,8 (C-3); 74,7 (C-4); 67,7 (C-6); 62,5 (C-1); 17,0 (C-7).

α -Pyranose: δ (ppm)=97,7 (C-2); 70,9 (C-4); 69,0 (C-5); 68,1 (C-3); 64,5 (C-6); 63,9 (C-1); 16,9 (C-7).

α -Furanose: δ (ppm)=104,5 (C-2); 84,8 (C-5); 82,0 (C-3); 76,0 (C-4); 66,8 (C-6); 62,8 (C-1); 17,3 (C-7)

14.2 Darstellung von 7d7FSh (63)

Synthese: Methyl-2,3-O-isopropyliden-5-desoxy-5-fluor-β-D-ribofuranoid (74)



Es wurden 1,81 g (6,38 mmol, 1 Äq) **72** in 25 mL Acetonitril vorgelöst. Nach Zugabe von TBAF (3,52 g, 13,2 mmol, 2 Äq) wurde das Reaktionsgemisch unter Reflux für 24 h gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (nicht unter 100 mbar bei 45 °C). Die anschließende MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (10:0); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (85:15). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (452 mg, 2,19 mmol, 34 %). Angelehnt an DOWNEY *et al.*^[78]

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,54 (Cyclohexan/Ethylacetat (8:2), Anisaldehyd)

C₉H₁₅FO₄ (206,21 g/mol)

HRMS (ESI): [M+H]⁺ (berechnet): m/z = 207,1027; [M+H]⁺ (gemessen): m/z = 207,1032 (error = -2,4 ppm, mean error = -10,0 ppm, mSigma = 14,9)

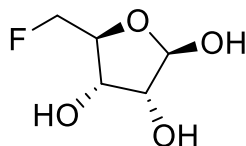
[M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 229,0847; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 229,0852 (error = -2,2 ppm, mean error = -2,3 ppm, mSigma = 5,4)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=4,98 (d, *J*=2,4 Hz, 1H, 1-H); 4,69 (d, *J*_{3,2}=6,0 Hz, 1H, 3-H); 4,58 (d, *J*_{2,3}=6,0 Hz, 1H, 2-H); 4,46-4,27 (m, 3H, 4-H, 5a-H, 5b-H); 3,32 (s, 3H, OCH₃); 1,48 und 1,32 (s, 3H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=112,8 (C(CH₃)₂); 109,4 (C-1); 85,2 (C-2); 84,6 (d, *J*_{C-4,F}=22,3 Hz, C-4); 83,1 (d, *J*_{C-5,F}=172,2 Hz, C-5); 81,2 (d, *J*_{C-3,F}=4,3 Hz, C-3); 55,0 (OCH₃); 26,5 und 25,0 (C(CH₃)₂).

¹⁹F-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=-224,79 bis -225,12 (m, 1F, C⁵-F).

Synthese: 5-Desoxy-5-fluor-D-ribofuranose (75)



Es wurden 430 mg (2,09 mmol, 1 Äq) **74** in 5,0 mL 0,04 N H₂SO₄-Lösung gemäß AAV6 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (7:3). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (247 mg, 1,63 mmol, 78 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,44 (Chloroform/Methanol (8:2), Anisaldehyd)

C₅H₉FO₄ (152,12 g/mol)

HRMS (ESI): [M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 175,0377; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 175,0380 (error = -1,9 ppm, mean error = -2,0 ppm, mSigma = 2,7)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=5,30 (d, J_{1,2}=1,4 Hz 1H, 1-H); 4,70 (ddd, J_{5a,F}=47,8 Hz, J_{5a,5b}=10,7 Hz, J=2,4 Hz, 1H, 5a-H); 4,59 (ddm, J_{5b,F}=48,0 Hz, J_{5b,5a}=10,7 Hz, 1H, 5b-H); 4,33 (dd, J=7,0 Hz, J_{3,2}=4,7 Hz, 1H, 3-H); 4,15 (dm, J_{4,F}=26,0 Hz, 1H, 4-H); 4,03 (ddd, J_{2,3}=4,7 Hz, J_{2,1}=1,4 Hz, J=1,4 Hz, 1H, 2-H).

α-Anomer: δ(ppm)=5,43 (d, J_{1,2}=4,0 Hz, 1H, 1-H); 4,65 (ddd, J_{5a,F}=47,4 Hz, J_{5a,5b}=10,7 Hz, J=2,4 Hz, 1H, 5a-H); 4,58 (ddm, J_{5b,F}=46,7 Hz, J_{5b,5a}=10,7 Hz, 1H, 5b-H); 4,28 (dm, J_{4,F}=27,6 Hz, 1H, 4-H); 4,20 (m, 1H, 3-H); 4,13 (dm, J_{2,1}=4,0 Hz, 1H, 2-H).

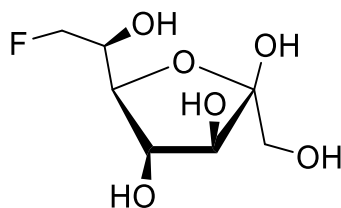
¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=101,1 (C-1); 83,4 (d, J_{C-5,F}=168,7 Hz, C-5); 80,5 (d, J_{C-4,F}=18,1 Hz, C-4); 75,0 (d, J_{C-2,F}=1,7 Hz, C-2); 69,4 (d, J_{C-3,F}=6,9 Hz, C-3).

α-Anomer: δ(ppm)= 96,5 (C-1); 82,9 (d, J_{C-5,F}=167,5 Hz, C-5); 81,0 (d, J_{C-4,F}=17,7 Hz, C-4); 70,6 (d, J_{C-2,F}=1,5 Hz, C-2); 69,2 (d, J_{C-3,F}=6,6 Hz, C-3).

¹⁹F-NMR (565 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=-228,62 (ddd, J_{F,5b}=48,0 Hz, J_{F,5a}=47,8 Hz, J_{F,4}=26,0 Hz, 1F, C⁵-F).

α-Anomer: δ(ppm)=-230,97 (ddd, J_{F,5a}=47,4 Hz, J_{F,5b}=46,7 Hz, J_{F,4}=27,6 Hz, 1F, C⁵-F).

Synthese: 7-Desoxy-7-fluor-sedoheptulose (7d7FSh, 63)



Es wurden 50,0 mg (329 μ mol, 1 \AA q) **75** gemäß AAV7 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (65:35). Die Schlussendliche HPLC-Aufreinigung erfolgte unter folgenden Bedingungen: Säule Semi-präparative Hi-Plex Ca; Säulentemperatur 85 °C; Fluss 1,0 mL/min. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (17,0 mg, 80,3 μ mol, 24 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,56 (Chloroform/Methanol (8:5), Anisaldehyd)

$C_7H_{13}FO_6$ (212,17 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 235,0588$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 235,0589$ (error = -0,2 ppm, mean error = -0,4 ppm, mSigma = 7,4)

1H -NMR (600 MHz, D_2O) β -Furanose: δ (ppm)=4,65 (ddd, $J_{7a,F}=48,3$ Hz, $J_{7a,7b}=10,2$ Hz, $J_{7a,6}=2,7$ Hz, 1H, 7a-H); 4,57 (ddd, $J_{7b,F}=47,7$ Hz, $J_{7b,7a}=10,2$ Hz, $J_{7b,6}=5,5$ Hz, 1H, 7b-H); 4,33 (dd, $J_{4,3}=7,8$ Hz, $J_{4,5}=6,8$ Hz, 1H, 4-H); 4,11 (d, $J_{3,4}=7,8$ Hz, 1H, 3-H); 4,03 (dddd, $J_{6,F}=24,1$ Hz, $J_{6,5}=6,5$ Hz, $J_{6,7b}=5,5$ Hz, $J_{6,7a}=2,7$ Hz, 1H, 6-H); 3,83 (dd, $J_{5,4}=6,8$ Hz, $J_{5,6}=6,5$ Hz 1H, 5-H); 3,61 (d, $J_{1a,1b}=12,1$ Hz, 1H, 1a-H); 3,56 (d, $J_{1b,1a}=12,1$ Hz, 1H, 1b-H).

α -Pyranose: δ (ppm)=4,77 (ddd, $J_{7a,F}=47,4$ Hz, $J_{7a,7b}=10,7$ Hz, $J_{7a,6}=3,7$ Hz, 1H, 7a-H); 4,70 (ddd, $J_{7b,F}=48,3$ Hz, $J_{7b,7a}=10,7$ Hz, $J_{7b,6}=1,4$ Hz, 1H, 7b-H); 4,17 (dddd, $J_{6,F}=28,8$ Hz, $J_{6,5}=10,6$ Hz, $J_{6,7a}=3,7$ Hz, $J_{6,7b}=1,4$ Hz, 1H, 6-H); 4,12 (m, 1H, 4-H); 3,98 (dm, $J_{5,6}=10,6$ Hz, 1H, 5-H); 3,98 (m, 1H, 3-H); 3,72 (d, $J_{1a,1b}=11,7$ Hz, 1H, 1a-H); 3,49 (d, $J_{1b,1a}=11,7$ Hz, 1H, 1b-H).

α -Furanose: δ (ppm)=4,65 (dm, $J_{7a,F}=46,8$ Hz, 1H, 7a-H); 4,57 (dm, $J_{7b,F}=46,9$ Hz, 1H, 7b-H); 4,21 (dd, $J_{4,5}=5,3$ Hz, $J_{4,3}=4,1$ Hz, 1H, 4-H); 4,11 (d, $J_{3,4}=4,1$ Hz, 1H, 3-H); 4,06 (m, 1H, 5-H); 4,05 (dm, $J_{6,F}=24,8$ Hz, 1H, 6-H); 3,68 (s, 2H, 1a-H und 1b-H).

^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O) β -Furanose: δ (ppm)=101,9 (C-2); 84,2 (d, $J_{7,F}=165,3$ Hz, C-7); 79,3 (d, $J_{5,F}=7,7$ Hz, C-5); 76,0 (C-4); 75,8 (C-3); 71,3 (d, $J_{6,F}=18,3$ Hz, C-6); 62,5 (C-1).

α -Pyranose: δ (ppm)=98,0 (C-2); 82,9 (d, $J_{7,F}=167,7$ Hz, C-7); 70,9 (C-4); 68,1 (C-3); 67,7 (d, $J_{6,F}=17,9$ Hz, C-6); 63,9 (C-1); 62,3 (d, $J_{5,F}=7,0$ Hz, C-5).

α -Furanose: $\delta(\text{ppm})=104,9$ (C-2); 84,2 (d, $J_{7,\text{F}}=165,6$ Hz, C-7); 81,6 (C-3); 81,0 (d, $J_{5,\text{F}}=7,5$ Hz, C-5); 77,0 (C-4); 70,2 (d, $J_{6,\text{F}}=18,4$ Hz, C-6); 62,7 (C-1).

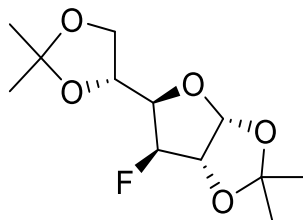
^{19}F -NMR (565 MHz, D_2O) β -Furanose: $\delta(\text{ppm})=-232,9$ (ddd, $J_{\text{F},7\text{a}}=48,3$ Hz, $J_{\text{F},7\text{b}}=47,7$ Hz, $J_{\text{F},6}=24,1$ Hz, 1F, $\text{C}^7\text{-F}$).

α -Pyranose: $\delta(\text{ppm})=-235,0$ (ddd, $J_{\text{F},7\text{b}}=48,3$ Hz, $J_{\text{F},7\text{a}}=47,4$ Hz, $J_{\text{F},6}=28,8$ Hz, 1F, $\text{C}^7\text{-F}$).

α -Furanose: $\delta(\text{ppm})=-232,3$ (ddd, $J_{\text{F},7\text{b}}=46,9$ Hz, $J_{\text{F},7\text{a}}=46,8$ Hz, $J_{\text{F},6}=24,8$ Hz, 1F, $\text{C}^7\text{-F}$).

14.3 Darstellung von 5,7dd5Flh (64)

Synthese: 3-Desoxy-3-fluor-1,2;5,6-di-O-isopropyliden- α -D-glucofuranose (81)



Es wurden 5,00 g (18,8 mmol, 1 Äq) Diacetonallose (**80**) unter Schlenk-Bedingungen in 40 mL wasserfreiem DCM gelöst, mit 5,1 mL wasserfreiem Pyridin (63 mmol, 3,3 Äq) versetzt und mittels eines Eis-Bades heruntergekühlt. Anschließend wurden innerhalb von 5 min 4,1 mL DAST (29 mmol, 1,6 Äq), mittels Spritze und Septum, zugetropft. Nach 30 min wurde das Eis-Bad entfernt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 55 mL mittels DCM aufgefüllt und mit folgenden Lösungen im Scheidetrichter gewaschen: gesättigte NaHCO₃-Lösung, gesättigte NaCl-Lösung und Reinstwasser. Nach trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde diese im Vakuum entfernt. Die schlussendliche MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (86:14); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (80:20). Es wurde ein gelbliches Öl erhalten (2,29 g, 8,75 mmol, 47 %). Angelehnt an MTASHOBYA.^[79]

Analytische Daten

DC Normalphase: R_F-Wert=0,84 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

C₁₂H₁₉FO₅ (262,28 g/mol)

HRMS (ESI): [M+H]⁺ (berechnet): m/z = 263,1289; [M+H]⁺ (gemessen): m/z = 263,1288 (error = 0,3 ppm, mean error = 0,1 ppm, mSigma = 6,2)

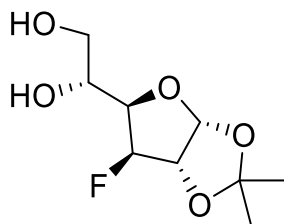
[M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 285,1109; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 285,1109 (error = 0 ppm, mean error = -0,2 ppm, mSigma = 0,5)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=5,94 (d, $J_{1,2}$ =3,7 Hz, 1H, 1-H); 4,99 (dd, $J_{3,F}$ =49,8 Hz, $J_{3,2}$ =2,2 Hz, 1H, 3-H); 4,68 (dd, $J_{2,F}$ =10,7 Hz, $J_{2,1}$ =3,7 Hz, 1H, 2-H); 4,27 (ddd, $J_{5,4}$ =8,3 Hz, $J_{5,6a}$ =6,1 Hz, $J_{5,6b}$ =4,9 Hz, 1H, 5-H); 4,11 (dd, $J_{6a,6b}$ =8,8 Hz, $J_{6a,5}$ =6,1 Hz, 1H, 6a-H); 4,11 (ddd, $J_{4,F}$ =29,1 Hz, $J_{4,5}$ =8,3 Hz, $J_{4,3}$ =2,2 Hz, 1H, 4-H); 4,02 (dd, $J_{6b,6a}$ =8,8 Hz, $J_{6b,5}$ =4,8 Hz, 1H, 6b-H); 1,49; 1,43; 1,35 und 1,31 (s, 3H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=112,5 (C(CH₃)₂); 109,6 (C(CH₃)₂); 105,3 (C-1); 94,0 (d, $J_{3,F}$ =183,9 Hz, C-3); 82,7 (d, $J_{2,F}$ =32,9 Hz, C-2); 80,8 (d, $J_{4,F}$ =19,1 Hz, C-4); 72,0 (d, $J_{5,F}$ =7,2 Hz, C-5); 67,3 (C-6); 27,0; 26,8; 26,3 und 25,3 (C(CH₃)₂).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=-207,6 (ddd, $J_{F,3}$ =49,8 Hz, $J_{F,4}$ =29,1 Hz, $J_{F,2}$ =10,7 Hz, 1F, C³-F).

Synthese: 3-Desoxy-3-fluor-1,2-O-isopropyliden- α -D-glucofuranose (82)



Es wurden 2,29 g (8,75 mmol, 1 Äq) **81** gemäß AAV4 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (1,88 g, 8,47 mmol, 97 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

$C_9H_{15}FO_5$ (222,21 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 223,0976$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 223,0977$ (error = -0,3 ppm, mean error = -0,5 ppm, mSigma = 1,2)

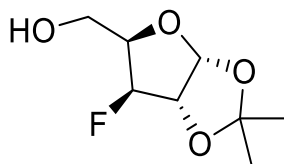
$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 245,0796$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 245,0797$ (error = -0,4 ppm, mean error = -0,4 ppm, mSigma = 1,2)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=5,94 (d, $J_{1,2}=3,8$ Hz, 1H, 1-H); 5,08 (dd, $J_{3,F}=49,8$ Hz, $J_{3,4}=2,1$ Hz, 1H, 3-H); 4,68 (dd, $J_{2,F}=10,8$ Hz, $J_{2,1}=3,8$ Hz, 1H, 2-H); 4,11 (ddd, $J_{4,F}=29,3$ Hz, $J_{4,5}=8,9$ Hz, $J_{4,3}=2,1$ Hz, 1H, 4-H); 3,91 (ddd, $J_{5,4}=8,9$ Hz, $J_{5,6a}=5,6$ Hz, $J_{5,6b}=2,8$ Hz, 1H, 5-H); 3,83 (dd, $J_{6a,6b}=11,7$ Hz, $J_{6a,5}=2,8$ Hz, 1H, 6a-H); 3,69 (dd, $J_{6b,6a}=11,7$ Hz, $J_{6b,5}=5,6$ Hz, 1H, 6b-H); 1,47 und 1,30 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=112,5 ($C(CH_3)_2$); 105,2 (C-1); 94,1 (d, $J_{3,F}=183,9$ Hz, C-3); 82,4 (d, $J_{2,F}=33,1$ Hz, C-2); 79,7 (d, $J_{4,F}=19,1$ Hz, C-4); 68,4 (d, $J_{5,F}=6,9$ Hz, C-5); 64,1 (C-6); 26,6 und 26,3 ($C(CH_3)_2$).

^{19}F -NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=-207,9 (ddd, $J_{F,3}=49,8$ Hz, $J_{F,4}=29,3$ Hz, $J_{F,2}=10,8$ Hz, 1F, C^3 -F).

Synthese: 3-Desoxy-3-fluor-1,2-O-isopropyliden- α -D-xylofuranose (83)



Es wurden 1,83 g (8,24 mmol, 1 Äq) **82** gemäß AAV5 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die anschließende MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (86:14); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (50:50). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (1,16 g, 6,06 mmol, 74 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,55 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

$C_8H_{13}FO_4$ (192,19 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 193,0871$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 193,0873$ (error = -1,3 ppm, mean error = -1,9 ppm, mSigma = 4,5)

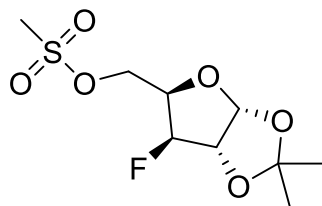
$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 215,0690$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 215,0692$ (error = -1,0 ppm, mean error = -1,2 ppm, mSigma = 1,4)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=5,97 (d, $J_{1,2}=3,8$ Hz, 1H, 1-H); 4,96 (dd, $J_{3,F}=50,3$ Hz, $J_{3,4}=2,3$ Hz, 1H, 3-H); 4,68 (dd, $J_{2,F}=11,1$ Hz, $J_{2,1}=3,8$ Hz, 1H, 2-H); 4,31 (dddd, $J_{4,F}=30,2$ Hz, $J_{4,5a}=6,6$ Hz, $J_{4,5b}=5,7$ Hz, $J_{4,3}=2,3$ Hz, 1H, 4-H); 3,89 (ddm, $J_{5a,5b}=11,7$ Hz, $J_{5a,4}=6,6$ Hz, 1H, 5a-H); 3,84 (dd, $J_{5b,5a}=11,7$ Hz, $J_{5b,4}=5,7$ Hz, 1H, 5b-H); 1,47 und 1,30 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=112,4 ($C(CH_3)_2$); 104,9 (C-1); 94,2 (d, $J_{3,F}=183,3$ Hz, C-3); 82,9 (d, $J_{2,F}=32,5$ Hz, C-2); 80,4 (d, $J_{4,F}=19,0$ Hz, C-4); 59,8 (d, $J_{5,F}=9,7$ Hz, C-5); 26,7 und 26,3 ($C(CH_3)_2$).

^{19}F -NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=-208,8 (ddd, $J_{F,3}=50,3$ Hz, $J_{F,4}=30,2$ Hz, $J_{F,2}=11,1$ Hz, 1F, C^3 -F).

Synthese: 3-Desoxy-3-fluor-1,2-O-isopropyliden-5-O-mesylyl- α -D-xylofuranose (84)



Es wurden 93,0 mg (484 μ mol, 1 Äq) **83** in 20 mL DCM gemäß AAV2 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein gelbes Öl erhalten, welches in der Kälte auskristallisierte (125 mg, 463 μ mol, 96 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,49 (Cyclohexan/Ethylacetat (7:3), Anisaldehyd)

$C_9H_{15}FO_6S$ (270,27 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 271,0646$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 271,0647$ (error = -0,1 ppm, mean error = 0,9 ppm, mSigma = 6,3)

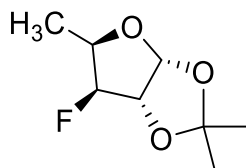
$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 293,0466$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 293,0466$ (error = -0,3 ppm, mean error = 1,2 ppm, mSigma = 8,0)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=5,98 (d, $J_{1,2}=3,7$ Hz, 1H, 1-H); 4,99 (dd, $J_{3,F}=50,3$ Hz, $J_{3,4}=2,3$ Hz, 1H, 3-H); 4,70 (dd, $J_{2,F}=10,8$ Hz, $J_{2,1}=3,7$ Hz, 1H, 2-H); 4,47 (dddd, $J_{4,F}=28,0$ Hz, $J=7,2$ Hz, $J=5,2$ Hz, $J_{4,3}=2,3$ Hz, 1H, 4-H); 4,41 (m, 2H, 5a-H und 5b-H); 3,05 (s, 3H, Mesyl- CH_3); 1,47 und 1,31 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=112,8 ($C(CH_3)_2$); 105,2 (C-1); 93,8 (d, $J_{3,F}=184,4$ Hz, C-3); 82,4 (d, $J_{2,F}=31,8$ Hz, C-2); 77,5 (d, $J_{4,F}=18,5$ Hz, C-4); 66,0 (d, $J_{5,F}=11,0$ Hz, C-5); 37,6 (Mesyl- CH_3); 26,7 und 26,3 ($C(CH_3)_2$).

^{19}F -NMR (376 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=-208,7 (dddd, $J_{F,3}=50,3$ Hz, $J_{F,4}=28,0$ Hz, $J_{F,2}=10,8$ Hz, $J_{F,2}=2,3$ Hz, 1F, C^3 -F).

Synthese: 3,5-Dideoxy-3-fluor-1,2-O-isopropyliden- α -D-xylofuranose (85)



Es wurden 367 mg (1,36 mmol, 1 Äq) **84** in 5 mL DMSO gemäß AAV3 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (151 mg, 854 μ mol, 63 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,78 (Pentan/Diethylether (8:2), Anisaldehyd)

$C_8H_{13}FO_3$ (176,19 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 177,0921$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 177,0928$ (error = -3,8 ppm, mean error = -12,8 ppm, mSigma = 28,2)

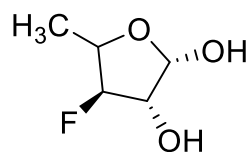
$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 199,0741$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 199,0749$ (error = -4,1 ppm, mean error = -0,7 ppm, mSigma = 21,2)

1H -NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm)=5,90 (d, $J_{1,2}$ =4,0 Hz, 1H, 1-H); 4,72 (dd, $J_{3,F}$ =50,4 Hz, $J_{3,4}$ =2,2 Hz, 1H, 3-H); 4,66 (dd, $J_{2,F}$ =11,0 Hz, $J_{2,1}$ =4,0 Hz, 1H, 2-H); 4,47 (ddq, $J_{4,F}$ =29,5 Hz, $J_{4,5}$ =6,5 Hz, $J_{4,3}$ =2,2 Hz, 1H, 4-H); 1,45 und 1,29 (s, 3H, $C(CH_3)_2$); 1,28 (dd, $J_{5,4}$ =6,5 Hz, J =1,2 Hz, 3H, 5-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm)=112,0 ($C(CH_3)_2$); 105,0 (C-1); 95,8 (d, $J_{3,F}$ =184,1 Hz, C-3); 83,5 (d, $J_{2,F}$ =32,9 Hz, C-2); 76,0 (d, $J_{4,F}$ =20,2 Hz, C-4); 26,7 und 26,3 ($C(CH_3)_2$); 12,6 (d, $J_{5,F}$ =9,0 Hz, C-5).

^{19}F -NMR (376 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm)=-209,3 (ddd, $J_{F,3}$ =50,4 Hz, $J_{F,4}$ =29,5 Hz, $J_{F,2}$ =11,0 Hz, 1F, C^3 -F).

Synthese: 3,5-Didesoxy-3-fluor-D-xylofuranose (86)



Es wurden 1,17 g (6,66 mmol, 1 Äq) **85** in 15 mL 0,04 N H₂SO₄-Lösung gemäß AAV6 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (80:20); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (15:85). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (503 mg, 3,69 mmol, 55 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_F-Wert=0,55 (Cyclohexan/Ethylacetat (25:75), Anisaldehyd)

C₅H₉FO₃ (136,12 g/mol)

HRMS (ESI): [M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 159,0428; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 159,0432 (error = -2,7 ppm, mean error = -2,2 ppm, mSigma = 7,0)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=5,24 (s, 1H, 1-H); 4,86 (dd, J_{3,F}=50,9 Hz, J_{3,4}=3,3 Hz, 1H, 3-H); 4,42 (ddq, J_{4,F}=29,8 Hz, J_{4,5}=6,7 Hz, J_{4,3}=3,3 Hz, 1H, 4-H); 4,28 (d, J_{2,F}=13,3 Hz, 1H, 2-H); 1,36 (dd, J_{5,4}=6,7 Hz, J_{5,F}=1,9 Hz, 3H, 5-H).

α-Anomer: δ(ppm)=5,49 (d, 1H, J_{1,2}=4,5 Hz, 1-H); 4,95 (ddd, J_{3,F}=52,3 Hz, J_{3,4}=3,6 Hz, J_{3,2}=2,2 Hz, 1H, 3-H); 4,47 (ddq, J_{4,F}=27,3 Hz, J_{4,5}=6,6 Hz, J_{4,3}=3,6 Hz, 1H, 4-H); 4,38 (ddd, J_{2,F}=19,2 Hz, J_{2,1}=4,5 Hz, J_{2,3}=2,2 Hz, 1H, 2-H); 1,27 (dd, J_{5,4}=6,6 Hz, J_{5,F}=2,2 Hz, 3H, 5-H).

Offene Form: δ(ppm)=5,06 (d, 1H, J_{1,2}=6,8 Hz, 1-H); 4,50 (ddd, J_{3,F}=47,7 Hz, J_{3,4}=7,3 Hz, J_{3,2}=2,0 Hz, 1H, 3-H); 4,13 (ddq, J_{4,F}=15,4 Hz, J_{4,3}=7,3 Hz, J_{4,5}=6,5 Hz, 1H, 4-H); 3,59 (ddd, J_{2,F}=28,9 Hz, J_{2,1}=6,8 Hz, J_{2,3}=2,0 Hz, 1H, 2-H); 1,23 (dd, J_{5,4}=6,5 Hz, J_{5,F}=0,7 Hz, 3H, 5-H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=101,8 (C-1); 96,0 (d, J_{3,F}=183,3 Hz, C-3); 79,0 (d, J_{2,F}=27,4 Hz, C-2); 77,6 (d, J_{4,F}=21,1 Hz, C-4); 13,3 (d, J_{5,F}=11,1 Hz, C-5).

α-Anomer: δ(ppm)=97,6 (d, J_{3,F}=182,4 Hz, C-3); 95,5 (d, J_{1,F}=3,7 Hz, C-1); 75,0 (d, J_{2,F}=28,2 Hz, C-2); 74,4 (d, J_{4,F}=21,0 Hz, C-4); 12,6 (d, J_{5,F}=11,0 Hz, C-5).

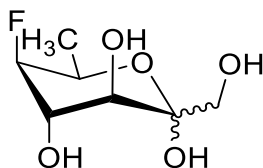
Offene Form: δ(ppm)=96,1 (d, J_{3,F}=174,3 Hz, C-3); 89,1 (d, J_{1,F}=7,0 Hz, C-1); 72,5 (d, J_{2,F}=18,0 Hz, C-2); 66,7 (d, J_{4,F}=19,5 Hz, C-4); 17,1 (d, J_{5,F}=7,8 Hz, C-5).

¹⁹F-NMR (376 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=-201,3 (ddd, J_{F,3}=50,1 Hz, J_{F,4}=29,8 Hz, J_{F,2}=13,3 Hz, 1F, C³-F).

α-Anomer: δ(ppm)=-202,7 (ddd, J_{F,3}=52,3 Hz, J_{F,4}=27,3 Hz, J_{F,2}=19,2 Hz, 1F, C³-F).

Offene Form: δ(ppm)=-208,6 (ddd, J_{F,3}=47,7 Hz, J_{F,2}=28,9 Hz, J_{F,4}=15,4 Hz, 1F, C³-F).

Synthese: 5,7-Didesoxy-5-fluor-idoheptulose (5,7dd5FIh, 64)



Es wurden 14,3 mg (105 μ mol, 1 Äq) **86** gemäß AAV7 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (8:2). Die Schlussendliche HPLC-Aufreinigung erfolgte unter folgenden Bedingungen: Säule Semi-präparative Hi-Plex Ca; Säulentemperatur 85 °C; Fluss 1,0 mL/min. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (2,61 mg, 13,3 μ mol, 13 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,48 (Chloroform/Methanol (8:2), Anisaldehyd)

$C_7H_{13}FO_5$ (196,17 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 219,0639$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 219,0634$ (error = -0,5 ppm, mean error = -0,9 ppm, mSigma = 3,2)

1H -NMR (700 MHz, D_2O) α/β -Pyranose: δ (ppm)=4,47 (dm, $J_{5,F}$ =45,0 Hz, 1H, 5-H); 4,41 (dqm, $J_{6,F}$ =33,6 Hz, $J_{6,7}$ =6,8 Hz, 1H, 6-H); 4,15 (ddm, $J_{4,F}$ =10,3 Hz, $J_{4,3}$ =3,4 Hz, 1H, 4-H); 3,74 (d, $J_{3,4}$ =3,4 Hz, 1H, 3-H); 3,72 (d, $J_{1a,1b}$ =11,7 Hz, 1H, 1a-H); 3,51 (d, $J_{1b,1a}$ =11,7 Hz, 1H, 1b-H); 1,29 (d, $J_{7,6}$ =6,8 Hz, 3H, 7-H).

Offenkettig: δ (ppm)=4,64 (d, $J_{1a,1b}$ =19,5 Hz, 1H, 1a-H); 4,54 (d, $J_{1b,1a}$ =19,5 Hz, 1H, 1b-H); 4,53 (m, 1H, 3-H); 4,48 (dm, $J_{5,F}$ =47,4 Hz, 1H, 5-H); 4,25 (ddd, $J_{4,F}$ =20,6 Hz, J =5,3 Hz, J =3,2 Hz, 1H, 4-H); 4,09 (ddq, $J_{6,F}$ =23,3 Hz, $J_{6,7}$ =6,7 Hz, J =4,4 Hz, 1H, 6-H); 1,28 (d, $J_{7,6}$ =6,7 Hz, 3H, 7-H).

β/α -Pyranose: δ (ppm)=4,56 (ddd, $J_{5,F}$ =49,0 Hz, $J_{5,4}$ =7,4 Hz, J =5,3 Hz, 1H, 5-H); 4,34 (ddm, $J_{6,F}$ =12,3 Hz, $J_{6,7}$ =6,9 Hz, 1H, 6-H); 4,16 (ddd, $J_{4,F}$ =13,2 Hz, $J_{4,3}$ =9,2 Hz, $J_{4,5}$ =7,4 Hz, 1H, 4-H); 3,68 (d, $J_{1a,1b}$ =11,8 Hz, 1H, 1a-H); 3,65 (d, $J_{3,4}$ =9,2 Hz, 1H, 3-H); 3,47 (d, $J_{1b,1a}$ =11,8 Hz, 1H, 1b-H); 1,36 (dd, $J_{7,6}$ =7,0 Hz, J =2,8 Hz, 3H, 7-H).

^{13}C -NMR (176 MHz, D_2O) α/β -Pyranose: δ (ppm)=97,9 (C-2); 90,3 (d, $J_{5,F}$ =179,4 Hz, C-5); 68,5 (d, $J_{4,F}$ =25,6 Hz, C-4); 66,5 (C-3); 64,2 (C-1); 63,1 (d, $J_{6,F}$ =19,6 Hz, C-6); 14,6 (d, $J_{7,F}$ =7,7 Hz, C-7).

Offenkettig: δ (ppm)=212,0 (C-2); 96,3 (d, $J_{5,F}$ =174,0 Hz, C-5); 75,2 (d, $J_{5,F}$ =6,0 Hz, C-3); 70,6 (d, $J_{4,F}$ =20,0 Hz, C-4); 65,9 (C-1); 65,8 (d, $J_{6,F}$ =19,7 Hz, C-6); 17,8 (d, $J_{7,F}$ =6,7 Hz, C-7).

β/α -Pyranose: δ (ppm)=98,3 (C-2); 92,1 (d, $J_{5,F}$ =181,7 Hz, C-5); 69,5 (d, $J_{6,F}$ =22,2 Hz, C-6); 69,1 (d, $J_{3,F}$ =7,0 Hz, C-3); 68,8 (d, $J_{4,F}$ =20,5 Hz, C-4); 63,4 (C-1); 15,7 (d, $J_{7,F}$ =4,6 Hz, C-7).

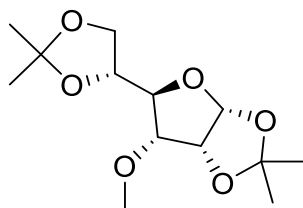
¹⁹F-NMR (658 MHz, D₂O) α/β-Pyranose: δ(ppm)=-202,7 (ddd, $J_{F,5}=45,0$ Hz, $J_{F,6}=33,6$ Hz, $J_{F,4}=10,3$ Hz, 1F, C⁵-F).

Offenkettig: δ(ppm)=-209,2 (ddd, $J_{F,5}=47,4$ Hz, $J_{F,6}=23,3$ Hz, $J_{F,4}=20,6$ Hz, 1F, C⁵-F).

β/α-Pyranose: δ(ppm)=-197,8 (ddd, $J_{F,5}=49,6$ Hz, $J_{F,4}=13,2$ Hz, $J_{F,6}=12,3$ Hz, 1F, C⁵-F).

14.4 Darstellung von 7d5MSh (65)

Synthese: 1,2;5,6-Di-*O*-isopropyliden-3-methoxy- α -D-allofuranose (87)



Es wurden 5,02 g (18,7 mmol, 1 Äq) Diacetonallose (**80**) unter Schlenk-Bedingungen in 50 mL Dioxan gelöst, mit KOH (3,38 g, 60,2 mmol, 3,2 Äq) versetzt und 1 h unter Reflux gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zuerst auf Raumtemperatur und danach mit einem Eisbad herabgekühlt. Unter weiterer Kühlung wurde Methyljodid (2,6 mL, 41,8 mmol, 2,2 Äq) über eine Dauer von ca. 2 min der Reaktion zugetropft. Die Reaktion wurde weitere 30 min unter Kühlung gehalten. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt. Am nächsten Morgen wurde 10 mL einer 4,3 M KOH Lösung zum quenchen des restlichen Methyljodids zugegeben. Folgend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, das Reaktionsgemisch in 100 mL Reinstwasser aufgenommen und drei Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde im Anschluss mit wässriger NaCl Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und schlussendlich zur Trockne eingengt. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (5,05 g, 18,4 mmol, 98 %). Angelehnt an SHARMA *et al.*^[80]

Analytische Daten

DC Normalphase: R_F-Wert=0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat (8:2), Anisaldehyd)

C₁₃H₂₂O₆ (274,31 g/mol)

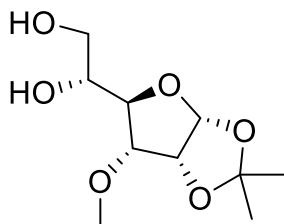
HRMS (ESI): [M+H]⁺ (berechnet): m/z = 275,1489; [M+H]⁺ (gemessen): m/z = 275,1490 (error = -0,4 ppm, mean error = -0,5 ppm, mSigma = 3,2)

[M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 297,1309; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 297,1310 (error = -0,3 ppm, mean error = -0,5 ppm, mSigma = 1,2)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=5,76 (d, J_{1,2}=3,7 Hz, 1H, 1-H); 4,68 (dd, J_{2,3}=4,3 Hz, J_{2,1}=3,7 Hz, 1H, 2-H); 4,37 (ddd, J_{5,6a}=7,3 Hz, J_{5,6b}=6,9 Hz, J_{5,4}=3,1 Hz, 1H, 5-H); 4,03 (dd, J_{4,3}=8,7 Hz, J_{4,5}=3,1 Hz, 1H, 4-H); 3,99 (d, J_{6a,5}=7,3 Hz, 1H, 6a-H); 3,99 (d, J_{6b,5}=6,9 Hz, 1H, 6b-H); 3,74 (dd, J_{3,4}=8,7 Hz, J_{3,2}=4,3 Hz, 1H, 3-H); 3,48 (s, 3H, OCH₃); 1,56; 1,43; 1,36 und 1,34 (s, 3H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=113,0 (C(CH₃)₂); 109,8 (C(CH₃)₂); 103,8 (C-1); 80,4 (C-3); 77,8 (C-4); 77,5 (C-2); 74,8 (C-5); 65,1 (C-6); 58,3 (OCH₃); 26,9; 26,6; 26,2 und 25,3 (C(CH₃)₂).

Synthese: 1,2-O-Isopropyliden-3-methoxy- α -D-allofuranose (88)



Es wurden 5,00 g (18,2 mmol, 1 Äq) **87** gemäß AAV4 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (85:15). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (3,49 g, 14,9 mmol, 82 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,39 (Chloroform/Methanol (9:1), Anisaldehyd)

$C_{10}H_{18}O_6$ (234,25 g/mol)

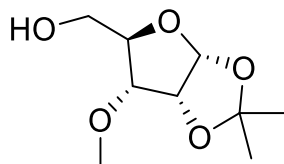
HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 235,1176$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 235,1181$ (error = -1,9 ppm, mean error = -1,7 ppm, mSigma = 4,5)

$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 257,0996$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 257,0999$ (error = -1,4 ppm, mean error = -1,6 ppm, mSigma = 3,4)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=5,78 (d, $J_{1,2}=3,6$ Hz, 1H, 1-H); 4,70 (dd, $J_{2,3}=4,3$ Hz, $J_{2,1}=3,6$ Hz, 1H, 2-H); 4,05-3,99 (m, 2H, 4-H, 5-H); 3,80 (dm, $J_{3,2}=4,3$ Hz, 1H, 3-H); 3,69 (m, 2H, 6a-H, 6b-H); 3,49 (s, 3H, OCH_3); 1,57 und 1,35 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=113,4 ($C(CH_3)_2$); 104,2 (C-1); 79,3 (C-3); 78,9 (C-4); 77,0 (C-2); 70,9 (C-5); 63,1 (C-6); 57,9 (OCH_3); 26,9 und 26,6 ($C(CH_3)_2$).

Synthese: 1,2-*O*-Isopropyliden-3-methoxy- α -D-ribofuranose (89)



Es wurden 3,50 g (14,9 mmol, 1 Äq) **88** gemäß AAV5 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (5:5); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (0:10). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (2,50 g, 12,2 mmol, 82 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,52 (Ethylacetat, Anisaldehyd)

$C_9H_{16}O_5$ (204,22 g/mol)

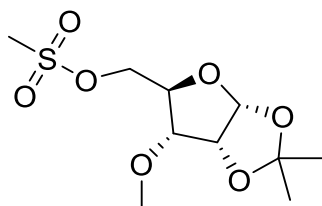
HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 205,1071$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 205,1073$ (error = -1,2 ppm, mean error = -0,3 ppm, mSigma = 6,1)

$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 227,0890$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 227,0891$ (error = -0,6 ppm, mean error = -0,9 ppm, mSigma = 1,0)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=5,76 (d, $J_{1,2}=3,6$ Hz, 1H, 1-H); 4,69 (dd, $J_{2,3}=4,3$ Hz, $J_{2,1}=3,6$ Hz, 1H, 2-H); 4,04 (ddd, $J_{4,3}=9,1$ Hz, $J_{4,5b}=3,0$ Hz, $J_{4,5a}=2,5$ Hz, 1H, 4-H); 3,94 (dd, $J_{5a,5b}=12,5$ Hz, $J_{5a,4}=2,5$ Hz, 1H, 5a-H); 3,71 (dd, $J_{3,4}=9,1$ Hz, $J_{3,2}=4,3$ Hz, 1H, 3-H); 3,67 (dd, $J_{5b,5a}=12,5$ Hz, $J_{5b,4}=3,0$ Hz, 1H, 5b-H); 3,49 (s, 3H, OCH_3); 1,57 und 1,36 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=113,3 ($C(CH_3)_2$); 104,1 (C-1); 79,4 (C-3); 78,8 (C-4); 77,4 (C-2); 60,8 (C-5); 58,6 (OCH_3); 26,9 und 26,6 ($C(CH_3)_2$).

Synthese: 1,2-*O*-Isopropyliden-5-mesylyl-3-methoxy- α -D-ribofuranose (90)



Es wurden 1,19 g (5,83 mmol, 1 Äq) **89** in 23 mL DCM gemäß AAV2 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein gelbes Öl erhalten, welches in der Kälte auskristallisierte (1,62 g, 5,74 mmol, 98 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,86 (Chloroform/Methanol (9:1), Anisaldehyd)

$C_{10}H_{18}O_7S$ (282,31 g/mol)

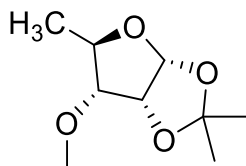
HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 283,0846$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 283,0848$ (error = -0,8 ppm, mean error = 3,3 ppm, mSigma = 4,9)

$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 305,0665$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 305,0667$ (error = -0,5 ppm, mean error = -0,1 ppm, mSigma = 7,2)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=5,75 (d, $J_{1,2}$ =3,6 Hz, 1H, 1-H); 4,68 (dd, $J_{2,3}$ =4,2 Hz, $J_{2,1}$ =3,6 Hz, 1H, 2-H); 4,49 (dd, $J_{5a,5b}$ =11,8 Hz, $J_{5a,4}$ =2,1 Hz, 1H, 5a-H); 4,32 (dd, $J_{5b,5a}$ =11,8 Hz, $J_{5b,4}$ =4,0 Hz, 1H, 5b-H); 4,15 (ddd, $J_{4,3}$ =9,2 Hz, $J_{4,5b}$ =4,0 Hz, $J_{4,5a}$ =2,1 Hz, 1H, 4-H); 3,62 (dd, $J_{3,4}$ =9,2 Hz, $J_{3,2}$ =4,2 Hz, 1H, 3-H); 3,48 (s, 3H, OCH_3); 3,03 (s, 3H, Mesyl- CH_3); 1,55 und 1,34 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm)=113,5 ($C(CH_3)_2$); 104,1 (C-1); 79,7 (C-3); 76,7 (C-2); 76,2 (C-4); 68,0 (C-5); 58,5 (OCH_3); 37,6 (Mesyl- CH_3); 26,8 und 26,5 ($C(CH_3)_2$).

Synthese: 5-Desoxy-1,2-O-isopropyliden-3-methoxy- α -D-ribofuranose (91)



Es wurden 1,62 g (5,74 mmol, 1 Äq) **90** in 15 mL DMSO gemäß AAV3 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem isokratischen Laufmittelgemisch Pentan/Diethylether (8:2). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (752 mg, 4,00 mmol, 70 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,33 (Pentan/Diethylether (8:2), Anisaldehyd)

$C_9H_{16}O_4$ (188,22 g/mol)

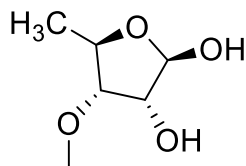
HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 189,1121$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 189,1121$ (error = 0,1 ppm, mean error = 0,5 ppm, mSigma = 5,2)

$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 211,0941$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 211,0943$ (error = -1,0 ppm, mean error = -1,3 ppm, mSigma = 3,6)

1H -NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm)=5,70 (d, $J_{1,2}$ =3,9 Hz, 1H, 1-H); 4,62 (dd, $J_{2,3}$ =4,3 Hz, $J_{2,1}$ =3,9 Hz, 1H, 2-H); 3,94 (dq, $J_{4,3}$ =8,9 Hz, $J_{4,5}$ =6,1 Hz, 1H, 4-H); 3,42 (s, 3H, OCH_3); 3,14 (dd, $J_{3,4}$ =8,9 Hz, $J_{3,2}$ =4,3 Hz, 1H, 3-H); 1,50 und 1,31 (s, 3H, $C(CH_3)_2$); 1,25 (d, $J_{5,4}$ =6,1 Hz, 1H, 5-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm)=112,6 ($C(CH_3)_2$); 104,3 (C-1); 86,5 (C-3); 77,3 (C-2); 74,2 (C-4); 58,2 (OCH_3); 26,7 und 26,6 ($C(CH_3)_2$); 17,6 (C-5).

Synthese: 5-Desoxy-3-methoxy-D-ribofuranose (92)



Es wurden 652 mg (3,47 mmol, 1 Äq) **91** in 10 mL H₂SO₄-Lösung gemäß AAV6 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem isokratischen Laufmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat (3:7). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (388 mg, 2,62 mmol, 76 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,48 (Ethylacetat, Anisaldehyd)

C₆H₁₂O₄ (148,16 g/mol)

HRMS (ESI): [M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 171,0628; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 171,0630 (error = -1,6 ppm, mean error = -2,0 ppm, mSigma = 2,7)

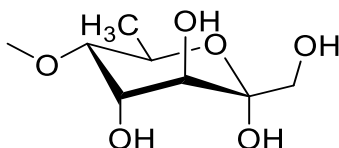
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=5,19 (d, J_{1,2}=1,8 Hz, 1H, 1-H); 4,18 (dd, J_{2,3}=4,6 Hz, J_{2,1}=1,8 Hz, 1H, 2-H); 4,06 (dq, J_{4,3}=6,6, J_{4,5}=6,4 Hz, 1H, 4-H); 3,71 (dd, J_{3,4}=6,6 Hz, J_{3,2}=4,6 Hz, 1H, 3-H); 3,43 (s, 1H, OCH₃); 1,34 (d, J_{5,4}=6,4 Hz, 3H, 5-H).

α-Anomer: δ(ppm)=5,32 (d, J_{1,2}=4,2 Hz, 1H, 1-H); 4,27 (dd, J_{2,3}=5,3 Hz, J_{2,1}=4,2 Hz, 1H, 2-H); 4,20 (dq, J_{4,5}=6,5 Hz, J_{4,3}=5,4 Hz, 1H, 4-H); 3,54 (dd, J_{3,4}=5,4 Hz, J_{3,2}=5,3 Hz, 1H, 3-H); 3,42 (s, 1H, OCH₃); 1,24 (d, J_{5,4}=6,5 Hz, 3H, 5-H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) β-Anomer: δ(ppm)=101,1 (C-1); 84,6 (C-3); 76,6 (C-4); 73,2 (C-2); 57,7 (OCH₃); 19,7 (C-5).

α-Anomer: δ(ppm)=95,7 (C-1); 83,9 (C-3); 76,5 (C-4); 69,3 (C-2); 57,6 (OCH₃); 18,5 (C-5).

Synthese: 7-Desoxy-5-methoxy-sedoheptulose (7d5MSh, 65)



Es wurden 50,3 mg (339 μ mol, 1 \AA q) **92** gemäß AAV7 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (7:3). Es wurde ein weißer Feststoff erhalten (43,5 mg, 209 μ mol, 62 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,51 (Chloroform/Methanol (8:2), Anisaldehyd)

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_6$ (208,21 g/mol)

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet): $m/z = 231,0839$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gemessen): $m/z = 231,0841$ (error = -0,8 ppm, mean error = -1,0 ppm, mSigma = 2,0)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) α -Pyranose: $\delta(\text{ppm})=4,28$ (dd, $J_{4,3}=3,8$ Hz, $J_{4,5}=3,1$ Hz, 1H, 4-H); 4,07 (dq, $J_{6,5}=10,0$ Hz, $J_{6,7}=6,2$ Hz, 1H, 6-H); 3,95 (d, $J_{3,4}=3,8$ Hz, 1H, 3-H); 3,65 (d, $J_{1a,1b}=11,6$ Hz, 1H, 1a-H); 3,41 (s, 3H, OCH_3); 3,39 (d, $J_{1b,1a}=11,6$ Hz, 1H, 1b-H); 3,27 (dd, $J_{5,6}=10,0$ Hz, $J_{5,4}=3,1$ Hz, 1H, 5-H); 1,26 (d, $J_{7,6}=6,2$ Hz, 3H, 7-H).

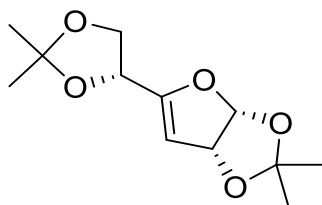
β -Pyranose: $\delta(\text{ppm})=4,23$ (dq, $J_{6,7}=7,2$ Hz, $J_{6,5}=2,6$ Hz, 1H, 6-H); 4,17 (dd, $J_{4,3}=9,4$ Hz, $J_{4,5}=3,3$ Hz, 1H, 4-H); 3,80 (d, $J_{3,4}=9,4$ Hz, 1H, 3-H); 3,64 (d, $J_{1a,1b}=11,7$ Hz, 1H, 1a-H); 3,52 (dd, $J_{5,4}=3,3$ Hz, $J_{5,6}=2,6$ Hz, 1H, 5-H); 3,48 (d, $J_{1b,1a}=11,7$ Hz, 1H, 1b-H); 3,41 (s, 3H, OCH_3); 1,37 (d, $J_{7,6}=7,2$ Hz, 3H, 7-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) α -Pyranose: $\delta(\text{ppm})=97,6$ (C-2); 78,5 (C-5); 67,7 (C-3); 66,7 (C-4); 63,9 (C-1); 63,4 (C-6); 56,3 (OCH_3); 17,0 (C-7).

β -Pyranose: $\delta(\text{ppm})=98,8$ (C-2); 82,4 (C-5); 70,8 (C-6); 67,7 (C-3); 66,3 (C-4); 64,0 (C-1); 57,6 (OCH_3); 19,4 (C-7).

14.5 Darstellung von 5,7ddGh (67)

Synthese: 3-Desoxy-1,2;5,6-di-O-isopropyliden- α -D-erythro-hex-3-enofuranose (94)



Es wurden 5,02 g (18,9 mmol, 1 Äq) Diacetonglucose (**93**) in 50 mL DCM gelöst, mit 10 mL Pyridin (122 mmol, 6,5 Äq) versetzt und mittels eines Eis-Bades heruntergekühlt. Anschließend wurden innerhalb von 10 min 8,5 mL Trifluormethansulfonsäureanhydrid (50 mmol, 2,6 Äq) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde daraufhin 2 h unter Kühlung gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung wie folgt gewaschen: zwei Mal gesättigte NaCl-Lösung, zwei Mal Reinstwasser. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Das trockene Zwischenprodukt wurde anschließend in 10 mL DMSO gelöst, mit 5,7 mL DBU (38 mmol, 2 Äq) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Am darauffolgenden Tag wurde die Reaktionslösung mit 75 mL Chloroform verdünnt und drei Mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (10:0); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (75:25). Es wurde ein weißer Feststoff erhalten (2,90 g, 12,0 mmol, 64 %). Angelehnt an HUSSAIN *et al.*^[81]

Analytische Daten

DC Normalphase: R_F-Wert=0,60 (Cyclohexan/Ethylacetat (3:1), Anisaldehyd)

C₁₂H₁₈O₅ (242,27 g/mol)

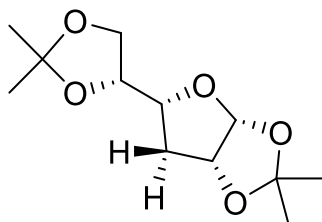
HRMS (ESI): [M+H]⁺ (berechnet): m/z = 243,1227; [M+H]⁺ (gemessen): m/z = 243,1228 (error = -0,4 ppm, mean error = -0,6 ppm, mSigma = 2,8)

[M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 265,1046; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 265,1046 (error = -0,2 ppm, mean error = -0,6 ppm, mSigma = 4,6)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=6,07 (d, $J_{1,2}$ =5,3 Hz, 1H, 1-H); 5,29 (ddd, $J_{2,1}$ =5,3 Hz, $J_{2,3}$ =2,3 Hz, $J_{2,5}$ =1,5 Hz, 1H, 2-H); 5,24 (dd, $J_{3,2}$ =2,3 Hz, $J_{3,5}$ =1,1 Hz, 1H, 3-H); 4,58 (dddd, $J_{5,6a}$ =6,8 Hz, $J_{5,6b}$ =5,8 Hz, $J_{5,2}$ =1,5 Hz, $J_{5,3}$ =1,1 Hz, 1H, 5-H); 4,14 (dd, $J_{6a,6b}$ =8,5 Hz, $J_{6a,5}$ =6,8 Hz, 1H, 6a-H); 3,96 (dd, $J_{6b,6a}$ =8,5 Hz, $J_{6b,5}$ =5,8 Hz, 1H, 6b-H); 1,46; 1,46; 1,44 und 1,38 (s, 3H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=160,2 (C4); 112,4 (C(CH₃)₂); 110,5 (C(CH₃)₂); 106,7 (C-1); 99,1 (C-3); 83,5 (C-2); 71,4 (C-5); 67,1 (C-6); 28,4; 28,1; 26,4 und 25,7 (C(CH₃)₂).

Synthese: 3-Desoxy-1,2;5,6-di-O-isopropyliden- α -D-gulofuranose (95)



Es wurden 2,88 g (11,9 mmol, 1 Äq) **94** unter Schlenk-Bedingungen in 30 mL Ethylacetat gelöst und mit 180 mg 10 % Pd/C versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter H₂ Atmosphäre (Ballondruck) 3 h gerührt. Hierbei wurde die H₂ Atmosphäre regelmäßig ausgetauscht. Anschließend wurde die Reaktionslösung über Celite abfiltriert und zur Trockne eingengt. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (10:0); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (60:40). Es wurde ein weißer Feststoff erhalten (986 mg, 4,04 mmol, 34 %). Angelehnt an PAWAR *et al.*^[82]

Analytische Daten

DC Normalphase: R_F-Wert=0,41 (Cyclohexan/Ethylacetat (7:3), Anisaldehyd)

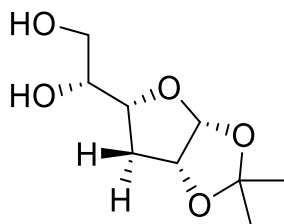
C₁₂H₂₀O₅ (244,29 g/mol)

HRMS (ESI): [M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 267,1203; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 267,1207 (error = -1,6 ppm, mean error = -1,8 ppm, mSigma = 4,0)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=5,79 (d, $J_{1,2}$ =3,8 Hz, 1H, 1-H); 4,71 (ddd, $J_{2,3a}$ =6,2 Hz, $J_{2,1}$ =3,8 Hz, $J_{2,3b}$ =1,2 Hz, 1H, 2-H); 4,42 (ddd, $J_{5,4}$ =8,4 Hz, $J_{5,6b}$ =6,9 Hz, $J_{5,6a}$ =6,5 Hz, 1H, 5-H); 4,10 (ddd, $J_{4,3a}$ =8,5 Hz, $J_{4,5}$ =8,4 Hz, $J_{4,3b}$ =4,0 Hz, 1H, 4-H); 4,03 (dd, $J_{6a,6b}$ =8,2 Hz, $J_{6a,5}$ =6,5 Hz, 1H, 6a-H); 3,60 (dd, $J_{6b,6a}$ =8,2 Hz, $J_{6b,5}$ =6,9 Hz, 1H, 6b-H); 2,19 (ddd, $J_{3a,3b}$ =14,3 Hz, $J_{3a,4}$ =8,5 Hz, $J_{3a,2}$ =6,2 Hz, 1H, 3a-H); 1,81 (ddd, $J_{3b,3a}$ =14,3 Hz, $J_{3b,4}$ =4,0 Hz, $J_{3b,2}$ =1,2 Hz, 1H, 3b-H); 1,56; 1,43; 1,36 und 1,31 (s, 3H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)=113,0 (C(CH₃)₂); 110,1 (C(CH₃)₂); 106,6 (C-1); 81,6 (C-4); 80,6 (C-2); 77,8 (C-5); 66,2 (C-6); 33,7 (C-3); 27,5; 26,9; 26,4 und 25,4 (C(CH₃)₂).

Synthese: 3-Desoxy-1,2-O-isopropyliden- α -D-gulofuranose (96)



Es wurden 956 mg (3,91 mmol, 1 Äq) **95** in 8 mL THF gelöst und mit einem Eis-Bad herabgekühlt. Daraufhin wurden ebenfalls vorgekühlte 3,2 mL 30 % HClO₄ zugegeben und das Reaktionsgemisch für 10 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Neutralisation mit wässriger Na₂CO₃-Lösung beendet und das Reaktionsgemisch zur Trockne eingengt. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (8:2). Es wurde ein weißer Feststoff erhalten (417 mg, 2,04 mmol, 52 %). Das Edukt konnte ebenfalls zurückgewonnen werden. Angelehnt an PAWAR *et al.*^[82]

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:9), Anisaldehyd)

C₉H₁₆O₅ (204,22 g/mol)

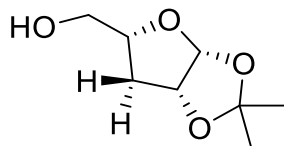
HRMS (ESI): [M+H]⁺ (berechnet): m/z = 205,1071; [M+H]⁺ (gemessen): m/z = 205,1075 (error = -2,2 ppm, mean error = -2,2 ppm, mSigma = 0,9)

[M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 227,0890; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 227,0895 (error = -2,3 ppm, mean error = -2,5 ppm, mSigma = 0,4)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=5,81 (d, J_{1,2}=3,9 Hz, 1H, 1-H); 4,76 (ddd, J_{2,3a}=6,2 Hz, J_{2,1}=3,9 Hz, J_{2,3b}=1,1 Hz, 1H, 2-H); 4,22 (ddd, J_{4,3a}=8,4 Hz, J_{4,5}=8,2 Hz, J_{4,3b}=3,0 Hz, 1H, 4-H); 4,37 (ddd, J_{5,4}=8,2 Hz, J_{5,6b}=4,8 Hz, J_{5,6a}=3,6 Hz, 1H, 5-H); 3,74 (dd, J_{6a,6b}=11,7 Hz, J_{6a,5}=3,6 Hz, 1H, 6a-H); 3,55 (dd, J_{6b,6a}=11,7 Hz, J_{6b,5}=4,8 Hz, 1H, 6b-H); 2,21 (ddd, J_{3a,3b}=14,4 Hz, J_{3a,4}=8,4 Hz, J_{3a,2}=6,2 Hz, 1H, 3a-H); 2,05 (ddd, J_{3b,3a}=14,4 Hz, J_{3b,4}=3,0 Hz, J_{3b,2}=1,1 Hz, 1H, 3b-H); 1,54 und 1,30 (s, 3H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=112,7 (C(CH₃)₂); 106,3 (C-1); 81,2 (C-4); 80,8 (C-2); 72,9 (C-5); 63,5 (C-6); 33,6 (C-3); 27,0 und 26,0 (C(CH₃)₂).

Synthese: 3-Desoxy-1,2-O-isopropyliden- α -L-lyxofuranose (97)



Es wurden 1,04 g (5,08 mmol, 1 Äq) **96** gemäß AAV5 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Hierbei wurde der H₂O-Anteil unter milden Bedingungen am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (5:5); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (0:10). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (614 mg, 3,52 mmol, 69 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,57 (Ethylacetat, Anisaldehyd)

C₈H₁₄O₄ (174,20 g/mol)

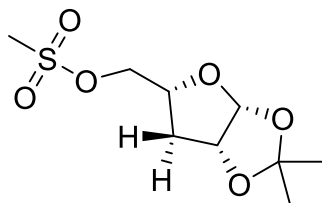
HRMS (ESI): [M+H]⁺ (berechnet): m/z = 175,0965; [M+H]⁺ (gemessen): m/z = 175,0967 (error = -1,4 ppm, mean error = -1,1 ppm, mSigma = 2,5)

[M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 197,0784; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 197,0786 (error = -1,0 ppm, mean error = -1,5 ppm, mSigma = 2,7)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=5,79 (d, J_{1,2}=3,9 Hz, 1H, 1-H); 4,73 (m, 1H, 2-H); 4,29 (m, 1H, 4-H); 3,80 (dd, J_{5a,5b}=11,6 Hz, J=8,0 Hz, 1H, 5a-H); 3,57 (dd, J_{5b,5a}=11,6 Hz, J=4,3 Hz, 1H, 5b-H); 2,17 (dm, J_{3a,3b}=14,4 Hz, 1H, 3a-H); 1,96 (dm, J_{3b,3a}=14,4 Hz, 1H, 3b-H); 1,52 und 1,29 (s, 3H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=112,5 (C(CH₃)₂); 106,5 (C-1); 81,8 (C-4); 80,8 (C-2); 65,1 (C-5); 33,2 (C-3); 27,1 und 26,0 (C(CH₃)₂).

Synthese: 3-Desoxy-1,2-O-isopropyliden-5-mesylyl- α -L-lyxofuranose (98)



Es wurden 709 mg (4,07 mmol, 1 Äq) **97** in 25 mL DCM gemäß AAV2 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Zusätzlich zu der in AAV2 vorgesehenen Aufreinigungsmethode wurde eine MPLC durchgeführt. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Cyclohexan/Ethylacetat (5:5); Ende: Cyclohexan/Ethylacetat (0:10). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (184 mg, 729 μ mol, 18 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,60 (Cyclohexan/Ethylacetat (3:7), Anisaldehyd)

$C_9H_{16}O_6S$ (252,28 g/mol)

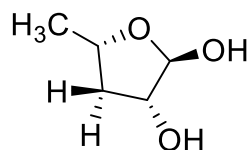
HRMS (ESI): $[M+H]^+$ (berechnet): $m/z = 253,0740$; $[M+H]^+$ (gemessen): $m/z = 253,0750$ (error = -3,8 ppm, mean error = 2020,2 ppm, mSigma = 10,7)

$[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 275,0560$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 275,0568$ (error = -2,9 ppm, mean error = -2,2 ppm, mSigma = 5,8)

1H -NMR (600 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm)=5,83 (d, $J_{1,2}$ =3,9 Hz, 1H, 1-H); 4,76 (ddd, $J_{2,3a}$ =5,8 Hz, $J_{2,1}$ =3,9 Hz, $J_{2,3b}$ =0,6 Hz, 1H, 2-H); 4,51 (dd, $J_{5a,5b}$ =10,7 Hz, $J_{5a,4}$ =8,7 Hz, 1H, 5a-H); 4,43 (dddd, $J_{4,5a}$ =8,7 Hz, $J_{4,3a}$ =8,7 Hz, $J_{4,5b}$ =4,3 Hz, $J_{4,3b}$ =2,0 Hz, 1H, 4-H); 4,17 (dd, $J_{5b,5a}$ =10,7 Hz, $J_{5b,4}$ =4,3 Hz, 1H, 5b-H); 3,83 (s, 3H, Mesyl- CH_3); 2,24 (ddd, $J_{3a,3b}$ =14,6 Hz, $J_{3a,4}$ =8,7 Hz, $J_{3a,2}$ =5,8 Hz, 1H, 3a-H); 2,03 (dddm, $J_{3b,3a}$ =14,6 Hz, $J_{3b,4}$ =2,0 Hz, $J_{3b,2}$ =0,6 Hz, 1H, 3b-H); 1,56 und 1,30 (s, 3H, $C(CH_3)_2$).

^{13}C -NMR (150 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm)=112,7 ($C(CH_3)_2$); 107,5 (C-1); 80,6 (C-2); 78,8 (C-4); 72,3 (C-5); 38,2 (Mesyl- CH_3); 33,9 (C-3); 26,8 und 25,7 ($C(CH_3)_2$).

Synthese: 3,5-Didesoxy- α -L-lyxofuranose (100)



Es wurden 184 mg (729 μ mol, 1 \ddot{A} q) **98** in 4 mL DMSO gemäß AAV3 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Einzig die Reaktionstemperatur wurde auf 100 °C erhöht. Die hieraus erhaltene Verbindung 3,5-Dideoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -L-lyxofuranose (**99**) wurde ohne vorherige analytische Untersuchung direkt gemäß AAV6 entschützt und anschließend aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (7:3). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (5,7 mg, 48 μ mol, 6,6 % (Ausbeute berechnet ausgehend von **98**)).

Analytische Daten

DC Normalphase **99**: R_f -Wert=0,71 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

DC Normalphase **100**: R_f -Wert=0,55 (Chloroform/Methanol (8:2), Anisaldehyd)

$C_5H_{10}O_3$ (118,13 g/mol)

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 141,0522$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 141,0526$ (error = -2,4 ppm, mean error = -3,4 ppm, mSigma = 5,1)

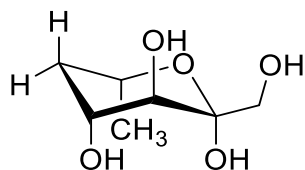
1H -NMR (600 MHz, MeOD) β -Anomer: δ (ppm)=5,16 (s, 1H, 1-H); 4,33 (ddq, $J_{4,3a}=6,9$ Hz, $J_{4,3b}=6,5$ Hz, $J_{4,5}=6,2$ Hz, 1H, 4-H); 4,10 (ddm, $J_{2,3a}=6,4$ Hz, $J_{2,3b}=3,4$ Hz, 1H, 2-H); 2,40 (ddd, $J_{3a,3b}=13,3$ Hz, $J_{3a,4}=6,9$ Hz, $J_{3a,2}=6,4$ Hz, 1H, 3a-H); 1,42 (ddd, $J_{3b,3a}=13,3$ Hz, $J_{3a,4}=6,5$ Hz, $J_{3a,2}=3,4$ Hz, 1H, 3b-H); 1,29 (d, $J_{5,4}=6,2$ Hz, 3H, 5-H).

α -Anomer: δ (ppm)=5,04 (d, $J_{1,2}=4,4$ Hz, 1H, 1-H); 4,11 (ddd, $J_{2,3b}=9,7$ Hz, $J_{2,3a}=7,2$ Hz, $J_{2,1}=4,4$ Hz, 1H, 2-H); 4,04 (ddq, $J_{4,3b}=9,4$ Hz, $J_{4,3a}=6,2$ Hz, $J_{4,5}=6,1$ Hz, 1H, 4-H); 2,25 (ddd, $J_{3a,3b}=12,0$ Hz, $J_{3a,2}=7,2$ Hz, $J_{3a,4}=6,1$ Hz, 1H, 3a-H); 1,61 (ddd, $J_{3b,3a}=12,0$ Hz, $J_{3a,2}=9,7$ Hz, $J_{3a,4}=9,4$ Hz, 1H, 3b-H); 1,30 (d, $J_{5,4}=6,2$ Hz, 3H, 5-H).

^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) β -Anomer: δ (ppm)=104,5 (C-1); 78,4 (C-2); 75,3 (C-4); 40,8 (C-3); 22,3 (C-5).

α -Anomer: δ (ppm)=97,2 (C-1); 73,9 (C-4); 73,4 (C-2); 39,2 (C-3); 23,3 (C-5).

Synthese: 5,7-Dideoxy- α -L-glucoheptulose (5,7ddGh, 67)



Es wurden 5,7 mg (48 μ mol, 1 Äq) **100** gemäß AAV7 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (6:4). Nach weiterer Aufreinigung mittels Kieselgelchromatographie (isokratisch: Chloroform/Methanol (8:2)) wurde ein farbloses Öl erhalten (1,2 mg, 6,7 μ mol, 14 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,27 (Chloroform/Methanol (8:2), Anisaldehyd)

$C_7H_{14}O_5$ (178,18 g/mol)

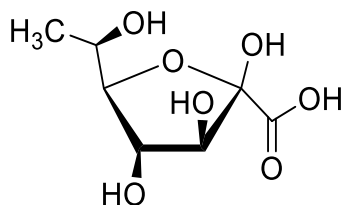
HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 201,0733$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 201,0736$ (error = -1,1 ppm, mean error = -1,9 ppm, mSigma = 5,9)

1H -NMR (600 MHz, D_2O) α -Pyranose: δ (ppm)=4,13 (ddq, $J_{6,5b}=12,6$ Hz, $J_{6,7}=6,3$ Hz, $J_{6,5a}=2,0$ Hz, 1H, 6-H); 3,94 (ddd, $J_{4,5b}=11,6$ Hz, $J_{4,3}=9,5$ Hz, $J_{4,5a}=5,0$ Hz, 1H, 4-H); 3,70 (d, $J_{1a,1b}=11,7$ Hz, 1H, 1a-H); 3,50 (d, $J_{1b,1a}=11,7$ Hz, 1H, 1b-H); 3,44 (d, $J_{3,4}=9,5$ Hz, 1H, 3-H); 2,06 (ddd, $J_{5a,5b}=12,8$ Hz, $J_{5a,4}=5,0$ Hz, $J_{5a,6}=2,0$ Hz, 1H, 5a-H); 1,38 (ddd, $J_{5b,5a}=12,8$ Hz, $J_{5b,6}=12,6$ Hz, $J_{5b,4}=11,6$ Hz, 1H, 5b-H); 1,20 (d, $J_{7,6}=6,3$ Hz, 3H, 7-H).

^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O): α -Pyranose: δ (ppm)=97,9 (C-2); 72,1 (C-3); 68,2 (C-4); 65,3 (C-6); 63,8 (C-1); 40,0 (C-5); 20,0 (C-7).

14.6 Darstellung von COOH-7dSh (68)

Synthese: 7-Desoxy-D-altro-heptulosensäure (COOH-7dSh, 68)



Katalysator-Modifikation: 6,4 mg 10 % Pt/C wurden in 2 mL Reinstwasser unter Schlenk-Bedingungen gelöst und der Katalysator unter H₂ Atmosphäre (Ballondruck) 30 min reduziert. Anschließend wurde die H₂ Atmosphäre durch N₂ ausgetauscht und 21 µg Urotropin (0,15 µmol), in 41 µL Reinstwasser gelöst, zugegeben und über Nacht gerührt.

Oxidationsschritt: 35 mg 7dSh (**56**, 180 µmol) gelöst in 2 mL Reinstwasser wurde unter Schlenk-Bedingungen der Katalysatorlösung zugegeben und auf 50 °C erhitzt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf ca. 7 mit NaHCO₃ wurde die Reaktion durch Austausch der Schutzgas-Atmosphäre mit O₂ (Ballondruck) gestartet. Die Reaktion wurde nach 7,5 h durch Abkühlen der Reaktionsmischung und abfiltrieren der Pt/C Rückstände beendet. Die Reaktionslösung wurde lyophilisiert, in Methanol aufgenommen und über einen 0,22 µm PVDF-Filter filtriert. Darauffolgend wurde eine säulenchromatographische Aufreinigung auf Kieselgel (Chloroform:Methanol 7:3 + 1 % Ameisensäure; Chloroform:Methanol 5:5 + 1 % Ameisensäure; Chloroform:Methanol 1:9 + 1 % Ameisensäure) und anschließend eine HPLC (Säule: Hi-Plex Ca) Aufreinigung durchgeführt. Zur Abtrennung noch enthaltener Formiatsalze wurde das Produkt in Reinstwasser aufgenommen, mit 0,1 N HCl auf einen pH-Wert von ca. 2,8 eingestellt und lyophilisiert. Nach dreimaliger Wiederholung dieser Prozedur wurde das lyophilisierte Produkt in Methanol gelöst und erneut filtriert. Es wurde so ein farbloses Öl erhalten (2,31 mg, 11,1 µmol, 6 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,61 (Chloroform/Methanol (1:9 + 1 % Ameisensäure), Anisaldehyd)

C₇H₁₂O₇ (208,17 g/mol)

HRMS (ESI): [M+H]⁺ (berechnet): m/z = 209,0656; [M+H]⁺ (gemessen): m/z = 209,0661 (error = -2,5 ppm, mean error = -2,5 ppm, mSigma = 3,9); [M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 231,0475; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 231,0480 (error = -2,2 ppm, mean error = -0,7 ppm, mSigma = 2,8); [M-H]⁻ (berechnet): m/z = 207,0510; [M-H]⁻ (gemessen): m/z = 207,0509 (error = -0,4 ppm, mean error = -0,6 ppm, mSigma = 1,1)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O) β-Furanose: δ(ppm)=4,29 (d, $J_{3,4}$ =8,2 Hz, 1H, 3-H); 4,17 (dd, $J_{4,3}$ =8,2 Hz, $J_{4,5}$ =7,4 Hz, 1H, 4-H); 3,97 (dq, $J_{6,7}$ =6,6 Hz, $J_{6,5}$ =4,4 Hz, 1H, 6-H); 3,83 (dd, $J_{5,4}$ =7,4 Hz, $J_{5,6}$ =4,4 Hz, 1H, 5-H); 1,23 (d, $J_{7,6}$ =6,6 Hz, 3H, 7-H).

α-Furanose: δ(ppm)=4,28 (m, 1H, 4-H); 4,10 (d, J =4,7 Hz, 1H, 3-H); 4,10 (m, 1H, 6-H); 4,00 (dd, J =6,3 Hz, J =3,2 Hz, 1H, 5-H); 1,23 (m, 3H, 7-H).

α-Pyranose: δ(ppm)=4,12 (m, 1H, 6-H); 4,07 (d, J =3,6 Hz, 1H, 3-H); 4,03 (m, 1H, 4-H); 3,64 (dd, J =10,1 Hz, J =3,4 Hz, 1H, 5-H); 1,32 (d, J =6,3 Hz, 3H, 7-H).

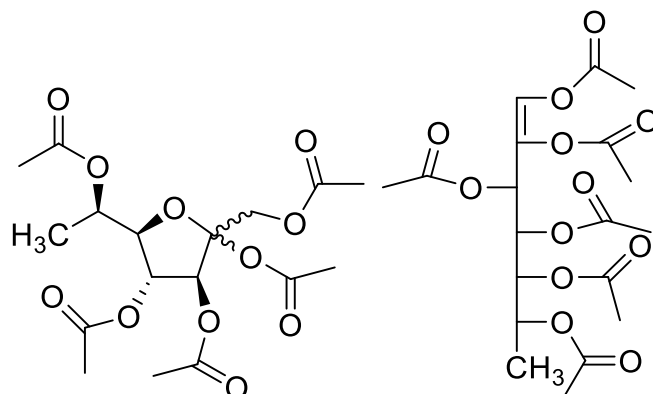
¹³C-NMR (150 MHz, D₂O) β-Furanose: δ(ppm)=175,2 (C-1); 99,5 (C-2); 83,8 (C-5); 78,7 (C-3); 74,4 (C-4); 67,6 (C-6); 17,0 (C-7).

α-Furanose: δ(ppm)=174,8 (C-1); 103,8 (C-2); 85,5 (C-5); 82,6 (C-3); 74,4 (C-4); 66,8 (C-6); 17,0 (C-7).

α-Pyranose: δ(ppm)=174,4 (C-1); 96,3 (C-2); 71,1 (C-4); 70,4 (C-3); 68,9 (C-5); 65,0 (C-6); 17,1 (C-7).

14.7 Darstellung von Perac-7dSh (69)

Synthese: Peracetyl-7-desoxy-sedoheptulose (Perac-(69)/ Hexaac-(114) 7dSh)



Es wurden 4,66 mg (24,0 μmol , 1 Äq) 7dSh (**56**) in 2,5 mL Pyridin gelöst und mittels eines Eis-Bades heruntergekühlt. Anschließend wurden 2,5 mL (26 mmol) Essigsäureanhydrid unter Rühren tropfenweise zugegeben. Nach 20 min wurden 3,5 mg (280 μmol , 1,2 Äq) DMAP zugegeben und für eine weitere Stunde unter Kühlung gerührt. Anschließend wurde das Eis-Bad entfernt und die Reaktionslösung über Nacht weiter gerührt. Am Folgetag wurde die Reaktion unter Kühlung im Eis-Bad durch Zugabe von 20 mL Reinstwasser gequenchet. Die wässrige Lösung wurde drei Mal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss zwei Mal mit je 90 mL Reinstwasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Die Schlussendliche HPLC-Aufreinigung (Säule: semi-präparative Kromasil-C18; Fluss 2 mL/min; 30 min Gradient: Start: Reinstwasser/Methanol (50:50); Ende: Reinstwasser/Methanol (45:55)) erbrachte die beiden Produkte Perac-7dSh (**69**, 1,5 mg; 3,7 μmol , 15 %) und Hexaac-7dSh (**114**, 0,62 mg; 1,4 μmol ; 6 %) als farblose Öle.

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,21 (Chloroform), Anisaldehyd, beide Verbindungen überlagern

Perac-7dSh: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ (404,37 g/mol); Hexaac-7dSh: $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ (446,41 g/mol)

HRMS (ESI): Perac-7dSh: $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): $m/z = 405,1391$; $[\text{M}+\text{H}]^+$ (gemessen): $m/z = 405,1399$ (error = -1,9 ppm, mean error = -1,7 ppm, mSigma = 3,2); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet): $m/z = 417,1211$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gemessen): $m/z = 417,1215$ (error = -0,9 ppm, mean error = -1,1 ppm, mSigma = 2,2);

Hexaac-7dSh: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet): $m/z = 469,1316$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gemessen): $m/z = 469,1330$ (error = -3,0 ppm, mean error = -3,3 ppm, mSigma = 1,8)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) Hexaac-7dSh: δ(ppm)=7,31 (s, 2H, 1a-H, 1b-H); 5,53 (d, $J_{3,4}=4,7$ Hz, 1H, 3-H); 5,38 (dd, $J_{4,5}=7,4$ Hz, $J_{4,3}=4,7$ Hz, 1H, 4-H); 5,22 (dd, $J_{5,4}=7,4$ Hz, $J_{5,6}=4,0$ Hz, 1H, 5-H); 5,02 (dq, $J_{6,7}=6,5$ Hz, $J_{6,5}=4,0$ Hz, 1H, 6-H); 2,28; 2,13; 2,13; 2,07; 2,04; 2,03 (s, 1H, 6xOCOCH₃); 1,25 (d, $J_{7,6}=6,5$ Hz, 1H, 7-H).

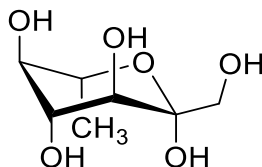
Perac-7dSh: δ(ppm)=5,77 (d, $J_{3,4}=3,8$ Hz, 1H, 3-H); 5,27 (dd, $J=6,0$ Hz, $J_{4,3}=3,8$ Hz, 1H, 4-H); 5,11 (dq, $J_{6,7}=6,5$ Hz, $J=5,1$ Hz, 1H, 6-H); 4,63 (d, $J_{1a,1b}=12,0$ Hz, 1H, 1a-H); 4,32 (d, $J_{1b,1a}=12,0$ Hz, 1H, 1b-H); 4,31 (m, 1H, 5-H); 2,16-2,00 (s, 1H, 6xOCOCH₃); 1,27 (d, $J_{7,6}=6,5$ Hz, 3H, 7-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) Hexaac-7dSh: δ(ppm)=170,1; 169,9; 169,8; 169,6; 167,0; 166,6 (6xOCOCH₃); 129,7 (C-2); 128,5 (C-1); 70,8 (C-5); 69,9 (C-4); 68,6 (C-6); 68,5 (C-3); 21,2; 20,9; 20,9; 20,8; 20,6; 20,5 (6xOCOCH₃); 14,8 (C-7).

Perac-7dSh: δ(ppm)=170,6-168,0 (6xOCOCH₃); 108,2 (C-2); 84,3 (C-5); 79,0 (C-3); 76,0 (C-4); 69,1 (C-6); 62,0 (C-1); 22,0-20,6 (6xOCOCH₃); 15,7 (C-7).

14.8 Darstellung von 7dGh (66)

Synthese: 7-Desoxy- α -L-glucoheptulose (7dGh, 66)



Diese Verbindung wurde von **JOHANNA RAPP** dargestellt,^[86] lediglich die NMR-spektroskopische Analytik wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Es wurden 50,0 mg (0,37 mmol, 1 Äq) 5-Desoxy-L-arabinose gemäß AAV7 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. In Abweichung zu AAV7 wurde weder der pH-Wert täglich neu eingestellt, noch wurde Li-HPA erneut zugegeben. Zudem wurde bei einem pH-Wert von 7,5 gestartet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (6:4). Die schlussendliche HPLC-Aufreinigung erfolgte unter folgenden Bedingungen: Säule Semi-präparative Hi-Plex Ca; Säulentemperatur 85 °C; Fluss 1,5 mL/min. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (18 mg, 93 μ mol, 25 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,51 (Chloroform/Methanol (8:5), Anisaldehyd)

$C_7H_{14}O_6$ (194,18 g/mol)

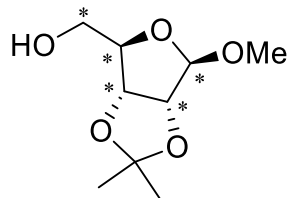
HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ (berechnet): $m/z = 217,0683$; $[M+Na]^+$ (gemessen): $m/z = 217,0683$ (error = -0,4 ppm, mean error = -0,4 ppm, mSigma = 0,5)

1H -NMR (600 MHz, D_2O) α -Pyranose: δ (ppm)=3,86 (dq, $J_{6,5}=9.7$ Hz, $J_{6,7}=6.3$ Hz, 1H, H-6), 3,69 (dd, $J_{4,3}=9.6$ Hz, $J_{4,5}=9.4$ Hz, 1H, H-4), 3,69 (d, $J_{1a,1b}=11.7$ Hz, 1H, H-1a), 3,52 (d, $J_{1b,1a}=11.7$ Hz, 1H, H-1b), 3,53 (d, $J_{3,4}=9.6$ Hz, 1H, H-3), 3,15 (dd, $J_{5,6}=9.7$ Hz, $J_{5,4}=9.4$ Hz, 1H, H-5), 1,27 (d, $J_{7,6}=6.3$ Hz, 3H, H-7).

^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O): α -Pyranose δ (ppm)= 97.3 (C-2), 75.1 (C-5), 73.4 (C-4), 70.6 (C-3), 68.2 (C-6), 63.6 (C-1), 16.7 (C-7).

14.9 Darstellung von $^{13}\text{C}_5\text{-7dSh}$ (56*)

Synthese: $^{13}\text{C}_5\text{-Methyl-2,3-O-isopropyliden-}\beta\text{-D-ribofuranosid}$ (71*)



Es wurden 500 mg (3,22 mmol, 1 Äq) $^{13}\text{C}_5\text{-D-Ribose}$ (70*) in 12,6 mL Aceton/Methanol-Gemisch gemäß AAV1 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (400 mg, 1,91 mmol, 59 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,63 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

$^{13}\text{C}_5\text{H}_{16}\text{O}_5\text{C}_4$ (209,18 g/mol)

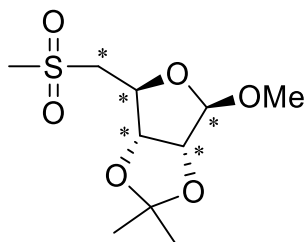
HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): $m/z = 210,1238$; $[\text{M}+\text{H}]^+$ (gemessen): $m/z = 210,1239$ (error = -0,2 ppm, mean error = 0,3 ppm, mSigma = 3,6)

$[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet): $m/z = 232,1058$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gemessen): $m/z = 232,1058$ (error = -0,2 ppm, mean error = -0,1 ppm, mSigma = 3,7)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=4,95 (dm, $J_{1,\text{C-1}}=174,4$ Hz, 1H, 1-H); 4,81 (dm, $J_{3,\text{C-3}}=160,6$ Hz, 1H, 3-H); 4,57 (dm, $J_{2,\text{C-2}}=158,7$ Hz, 1H, 2-H); 4,41 (dm, $J_{4,\text{C-4}}=155,1$ Hz, 1H, 4-H); 3,68 (ddm, $J_{5a,\text{C-5}}=143,8$ Hz, $J_{5a,5b}=12,6$ Hz, 1H, 5a-H); 3,59 (ddm, $J_{5b,\text{C-5}}=142,0$ Hz, $J_{5b,5a}=12,6$ Hz, 1H, 5b-H); 3,42 (d, $J_{\text{OCH}_3,\text{C-1}}=4,4$ Hz, 3H, -OCH₃); 1,47 und 1,30 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=112,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 109,8 (d, $J_{\text{C-1},\text{C-2}}=48,5$ Hz, C-1); 88,4 (dd, $J_{\text{C-4},\text{C-3}}=39,8$ Hz, $J_{\text{C-4},\text{C-5}}=38,9$ Hz, C-4); 85,9 (dd, $J_{\text{C-2},\text{C-1}}=48,5$ Hz, $J_{\text{C-2},\text{C-3}}=31,0$ Hz, C-2); 81,5 (ddm, $J_{\text{C-3},\text{C-4}}=39,8$ Hz, $J_{\text{C-3},\text{C-2}}=31,0$ Hz, C-3); 64,1 (dm, $J_{\text{C-5},\text{C-4}}=38,9$ Hz, C-5); 55,6 (m, -OCH₃); 26,4 und 24,8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

Synthese: $^{13}\text{C}_5$ -Methyl-2,3-*O*-isopropyliden-5-*O*-mesyl- β -D-ribofuranoid (72*)



Es wurden 400 mg (1,91 mmol, 1 Äq) **71*** in 6 mL DCM gemäß AAV2 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein gelbes Öl erhalten, welches in der Kälte auskristallisierte (557 mg, 1,93 mmol, 101 %, Methansulfonsäure als Verunreinigung enthalten).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,59 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

$^{13}\text{C}_5\text{H}_{18}\text{O}_7\text{SC}_5$ (287,27 g/mol)

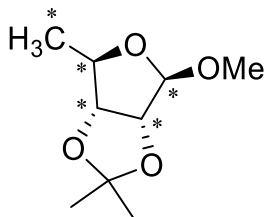
HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet): $m/z = 288,1014$; $[\text{M}+\text{H}]^+$ (gemessen): $m/z = 288,1013$ (error = 0,2 ppm, mean error = 0,7 ppm, mSigma = 7,9)

$[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet): $m/z = 310,0833$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gemessen): $m/z = 310,0831$ (error = 0,5 ppm, mean error = 0,9 ppm, mSigma = 5,4)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})=4,98$ (ddd, $J_{1,\text{C-1}}=173,9$ Hz, $J_{1,\text{C-2}}=7,5$ Hz, $J_{1,2}=3,0$ Hz, 1H, 1-H); 4,69 (dm, $J_{3,\text{C-3}}=154,5$ Hz, 1H, 3-H); 4,60 (ddm, $J_{2,\text{C-2}}=158,9$ Hz, $J_{2,1}=3,0$ Hz, 1H, 2-H); 4,40 (dm, $J_{4,\text{C-4}}=155,1$ Hz, 1H, 4-H); 4,20 (dm, $J_{5\text{a},\text{C-5}}=152,1$ Hz, 1H, 5a-H); 4,18 (dm, $J_{5\text{b},\text{C-5}}=154,1$ Hz, 1H, 5b-H); 3,34 (d, $J_{-\text{OCH}_3,\text{C-1}}=4,5$ Hz, 3H, -OCH₃); 3,06 (s, 1H, Mesyl-CH₃); 1,47 und 1,30 (s, 3H, C(CH₃)₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})=113,0$ (C(CH₃)₂); 109,7 (d, $J_{\text{C-1},\text{C-2}}=49,3$ Hz, C-1); 85,0 (dd, $J_{\text{C-2},\text{C-1}}=49,3$ Hz, $J_{\text{C-2},\text{C-3}}=30,7$ Hz, C-2); 83,9 (dd, $J_{\text{C-4},\text{C-5}}=42,5$ Hz, $J_{\text{C-4},\text{C-3}}=39,1$ Hz, C-4); 81,5 (ddd, $J_{\text{C-3},\text{C-4}}=39,1$ Hz, $J_{\text{C-3},\text{C-2}}=30,7$ Hz, $J_{\text{C-3},\text{C-5}}=5,5$ Hz, C-3); 68,5 (dd, $J_{\text{C-5},\text{C-4}}=42,5$ Hz, $J_{\text{C-5},\text{C-3}}=5,5$ Hz, C-5); 55,4 (m, -OCH₃); 37,9 (Mesyl-CH₃); 26,5 und 25,0 (C(CH₃)₂).

Synthese: ¹³C₅-Methyl-2,3-O-isopropyliden-5-desoxy-β-D-ribofuranoid (73*)



Es wurden 556 mg (1,91 mmol, 1 Äq, berechnet ausgehend von **71***) **72*** in 5 mL DMSO gemäß AAV3 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (358 mg, 1,85 mmol, 86 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,87 (Cyclohexan/Ethylacetat (1:1), Anisaldehyd)

¹³C₅H₁₆O₄C₄ (193,18 g/mol)

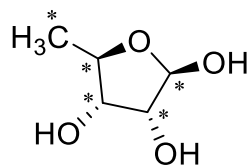
HRMS (ESI): [M+H]⁺ (berechnet): m/z = 194,1289; [M+H]⁺ (gemessen): m/z = 194,1294 (error = -2,4 ppm, mean error = -0,2 ppm, mSigma = 16,2)

[M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 216,1109; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 216,1111 (error = -1,3 ppm, mean error = -1,2 ppm, mSigma = 1,2)

¹H-NMR (700 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=4,92 (ddd, *J*_{1,C-1}=172,3 Hz, *J*_{1,C-2}=7,5 Hz, *J*_{1,2}=2,6 Hz, 1H, 1-H); 4,61 (ddm, *J*_{2,C-2}=161,4 Hz, *J*_{2,1}=2,6 Hz, 1H, 2-H); 4,49 (dm, *J*_{3,C-3}=155,8 Hz, 1H, 3-H); 4,32 (dm, *J*_{4,C-4}=149,6 Hz, 1H, 4-H); 3,31 (d, *J*_{OCH₃,C-1}=4,4 Hz, 3H, -OCH₃); 1,46 und 1,29 (s, 3H, C(CH₃)₂); 1,27 (dm, *J*_{5,C-5}=126,3 Hz, 3H, 5-H).

¹³C-NMR (176 MHz, CDCl₃) δ(ppm)=112,2 (C(CH₃)₂); 109,6 (dm, *J*_{C-1,C-2}=48,1 Hz, C-1); 85,9 (dm, *J*_{C-2,C-1}=48,1 Hz, C-2); 85,3 (dm, *J*_{C-3,C-4}=37,7 Hz, C-3); 83,2 (ddm, *J*_{C-4,C-3}=*J*_{C-4,C-5}=37,7 Hz, C-4); 54,5 (m, -OCH₃); 26,6 und 25,1 (C(CH₃)₂); 21,0 (dm, *J*_{C-5,C-4}=37,7 Hz, C-5).

Synthese: $^{13}\text{C}_5$ -5-Desoxy-D-ribofuranose (58*)



Es wurden 358 mg (1,85 mmol, 1 Äq) **73*** in 5 mL 0,04 N H_2SO_4 -Lösung gemäß AAV6 zur Reaktion gebracht, sowie anschließend aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (7:3). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (156 mg, 1,12 mmol, 61 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f -Wert=0,46 (Chloroform/Methanol (4:1), Anisaldehyd)

$^{13}\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$ (139,09 g/mol)

HRMS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet): $m/z = 162,0639$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (gemessen): $m/z = 162,0640$ (error = -0,5 ppm, mean error = -1,4 ppm, mSigma = 1,2)

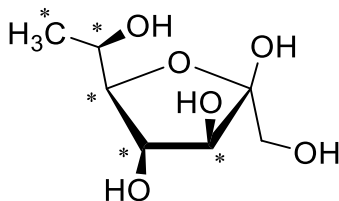
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) β -Furanose: $\delta(\text{ppm})=5,18$ (dm, $J_{1,\text{C}-1}=172,1$ Hz, 1H, 1-H); 4,00-3,95 (m, 3H, 2-H, 3-H, 4-H); 1,33 (dm, $J_{3,\text{C}-3}=126,8$ Hz, 3H, 5-H).

α -Furanose: $\delta(\text{ppm})=5,35$ (dm, $J_{1,\text{C}-1}=172,6$ Hz, 1H, 1-H); 4,14 (dm, $J_{2,\text{C}-2}=151,2$ Hz, 1H, 2-H); 4,12 (dm, $J_{4,\text{C}-4}=150,5$ Hz, 1H, 4-H); 3,80 (dm, $J_{3,\text{C}-3}=150,2$ Hz 1H, 3-H); 1,24 (dm, $J_{3,\text{C}-3}=126,8$ Hz, 3H, 5-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) β -Furanose: $\delta(\text{ppm})=100,8$ (m, C-1); 78,3 (d, $J_{\text{C}-4,\text{C}-5}=39,5$ Hz C-4); 75,2 (m, C-2 und C-3); 19,1 (d, $J_{\text{C}-5,\text{C}-4}=39,5$ Hz, C-5).

α -Furanose: $\delta(\text{ppm})=95,7$ (dm, $J_{\text{C}-1,\text{C}-2}=42,2$ Hz, C-1); 78,1 (dm, $J_{\text{C}-4,\text{C}-5}=39,9$ Hz C-4); 74,8 (m, C-3); 70,4 (dm, $J_{\text{C}-2,\text{C}-1}=42,2$ Hz, C-2); 17,8 (d, $J_{\text{C}-5,\text{C}-4}=39,9$ Hz, C-5).

Synthese: [3,4,5,6,7-¹³C₅]-7-Desoxy-sedoheptulose (¹³C₅-7dSh, 56*)



Es wurden 30,0 mg (216 μ mol, 1 Äq) **55*** gemäß AAV7 zur Reaktion gebracht, sowie aufgearbeitet. Die MPLC-Aufreinigung erfolgte mittels folgendem Gradienten: Start: Chloroform/Methanol (10:0); Ende: Chloroform/Methanol (6:4). Die schlussendliche HPLC-Aufreinigung erfolgte unter folgenden Bedingungen: Säule Semi-präparative Hi-Plex Ca; Säulentemperatur 85 °C; Fluss 1,5 mL/min. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (36,8 mg, 185 μ mol, 86 %).

Analytische Daten

DC Normalphase: R_f-Wert=0,56 (Chloroform/Methanol (8:5), Anisaldehyd)

¹³C₅H₁₄O₆C₂ (199,14 g/mol)

HRMS (ESI): [M+Na]⁺ (berechnet): m/z = 222,0850; [M+Na]⁺ (gemessen): m/z = 222,0852 (error = -0,6 ppm, mean error = -0,7 ppm, mSigma = 1,3)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) β -Furanose: δ (ppm)=4,21 (dm, $J_{4,C-4}$ =132,6 Hz, 1H, 4-H); 4,07 (dm, $J_{3,C-3}$ =141,2 Hz, 1H, 3-H); 3,95 (dm, $J_{6,C-6}$ =145,5 Hz, 1H, 6-H); 3,70 (m, 1H, 5-H); 3,63 (dd, $J_{1a,1b}$ =11,7 Hz, $J_{1a,C-3}$ =4,3 Hz, 1H, 1a-H); 3,54 (dd, $J_{1b,1a}$ =11,7 Hz, $J_{1b,C-3}$ =6,5 Hz, 1H, 1b-H); 1,20 (dm, $J_{7,C-7}$ =126,8 Hz, 3H, 7-H).

α -Pyranose: δ (ppm)=4,07 (dm, $J_{6,C-6}$ =141,7 Hz, 1H, 6-H); 4,03 (m, 1H, 4-H); 3,95 (m, 1H, 3-H); 3,66 (m, 1H, 1a-H); 3,57 (m, 1H, 5-H); 3,40 (dd, J =11,6 Hz, J =2,5 Hz, 1H, 1b-H); 1,26 (dm, $J_{7,C-7}$ =127,2 Hz, 3H, 7-H).

α -Furanose: δ (ppm)=4,11 (m, 1H, 4-H); 4,07 (m, 1H, 3-H); 3,99 (m, 1H, 6-H); 3,91 (m, 1H, 5-H); 3,65 (m, 1H, 1a-H); 3,62 (m, 1H, 1b-H); 1,21 (m, 3H, 7-H).

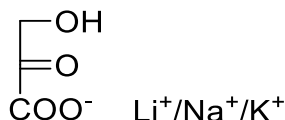
¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) β -Furanose: δ (ppm)=101,3 (dm, J =44,7 Hz, C-2); 83,5 (ddd, $J_{C-5,C-6}$ =42,6 Hz, $J_{C-5,C-4}$ =39,0 Hz, J =5,4 Hz, C-5); 75,8 (dm, $J_{C-3,C-4}$ =41,0 Hz C-3); 74,6 (dd, $J_{C-4,C-3}$ =41,0 Hz, $J_{C-4,C-5}$ =39,0 Hz, C-4); 67,6 (ddm, $J_{C-6,C-5}$ =42,6 Hz, $J_{C-6,C-7}$ =38,4 Hz, C-6); 62,4 (C-1); 17,0 (d, $J_{C-7,C-6}$ =38,4 Hz, C-7).

α -Pyranose: δ (ppm)=97,7 (m, C-2); 70,8 (ddm, J =38,9 Hz, J =38,7 Hz, C-4); 68,9 (m, C-5); 68,0 (m, C-3); 64,5 (m, C-6); 63,9 (C-1); 16,9 (m, C-7).

α -Furanose: δ (ppm)=104,4 (dm, J =46,9 Hz, C-2); 84,7 (ddm, $J_{C-5,C-6}$ =42,2 Hz, J =39,5 Hz, C-5); 81,9 (dm, J =40,6 Hz, C-3); 75,9 (m, C-4); 66,7 (ddm, $J_{C-6,C-5}$ =42,2 Hz, J =38,2 Hz, C-6); 62,7 (C-1); 17,3 (m, C-7)

14.10 Darstellung von Hydroxypyruvat (46)

Synthese: Li/Na/K-Hydroxypyruvat (46)



Es wurden 5,00 g (29,4 mmol, 1 Äq) 3-Brompyruvat (**59**) in 50 mL Reinstwasser vorgelöst. Anschließend wurde die jeweilige Base (LiOH/NaOH/KOH, 5 M, 11,7 mL, 2 Äq) langsam zuge tropft. Der pH-Wert durfte hierbei 8,5 nicht steigen. Das erste Äquivalent konnte hierbei zügig zugegeben werden. Nach vollständiger Zugabe wurde der pH-Wert mittels Zugabe von Eisessig auf 5 eingestellt und das Lösungsmittel auf ca. 10 mL eingeengt (Wasserbad: 40 °C). Hierbei konnte eine Trübung der Lösung beobachtet werden. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die restliche Reaktionslösung für 1-3 Tage im Kühlschrank gelagert. Das hierbei ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und mit wenig eiskaltem Reinstwasser nachgewaschen, um gelb-orangene Verunreinigungen zu entfernen. Nach Lyophilisation wurde ein leicht gelbliches Pulver erhalten (Li-HPA: 1,1 g, 9,6 mmol, 32 %; Na-HPA: 1,1 g, 9,0 mmol, 31 %; K-HPA: 2,79 g, 19,6 mmol, 67 %). Angelehnt an MORRIS *et al.*^[41]

Analytische Daten (für alle drei Verbindungen identisch)

C₃H₄O₄ (104,06 g/mol)

HRMS (ESI): Hydroxypyruvat [M-H]⁻ (berechnet): m/z = 103,0037; [M-H]⁻ (gemessen): m/z = 103,0036 (error = 0,3 ppm, mean error = 4112,1 ppm, mSigma = 8,5)

Hydrat [M-H]⁻ (berechnet): m/z = 121,0142; [M-H]⁻ (gemessen): m/z = 121,0142 (error = -0,0 ppm, mean error = -0,1 ppm, mSigma = 5,9)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) Hydroxypyruvat δ(ppm)=4,70 (s, 2H, 3-H).

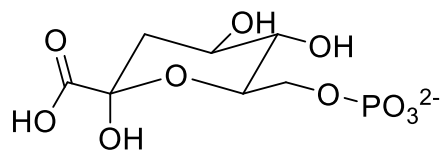
Hydrat δ(ppm)=3,66 (s, 2H, 3-H).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) Hydroxypyruvat δ(ppm)=202,6 (C-2); 167,5 (C-1); 66,1 (C-3).

Hydrat δ(ppm)=176,6 (C-1'); 94,3 (C-2'); 65,4 (C-3').

14.11 NMR-spektroskopische Analyse von DAHP (3)

3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat (DAHP, 3)



Analytische Daten

$C_7H_{13}O_{10}P$ (288,14 g/mol)

1H -NMR (600 MHz, D_2O) α -Pyranose: δ (ppm)=4,11 (m, 1H, 7a-H); 3,95 (ddd, $J_{4,3b}=11,8$ Hz, $J_{4,5}=9,5$ Hz, $J_{4,3a}=5,2$ Hz, 1H, 4-H); 3,94 (m, 1H, 7b-H); 3,81 (dm, $J_{6,5}=9,7$ Hz, 1H, 6-H); 3,61 (dd, $J_{5,6}=9,7$ Hz, $J_{5,4}=9,5$ Hz, 1H, 5-H); 2,19 (dd, $J_{3a,3b}=13,0$ Hz, $J_{3a,4}=5,2$ Hz, 1H, 3a-H); 1,84 (dd, $J_{3b,3a}=13,0$ Hz, $J_{3b,4}=11,8$ Hz, 1H, 3b-H).

^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O): α -Pyranose: δ (ppm)= 176,5 (C-1); 96,5 (C-2); 73,4 (d, $J_{C-2,P}=6,6$ Hz, C-6); 70,5 (C-5); 68,5 (C-4); 63,1 (d, $J_{C-7,P}=4,5$ Hz, C-7); 39,3 (C-3).

Abkürzungsverzeichnis

7dSh	7-Desoxy-D-sedoheptulose
7d7FSh	7-Desoxy-7-fluor-D-sedoheptulose
5,7dd5F1h	5,7-Didesoxy-5-fluor-D-idoheptulose
7d5MSh	7-Desoxy-5-methoxy-D-sedoheptulose
7dGh	7-Desoxy-L-glucoheptulose
5,7ddGh	5,7-Didesoxy-L-glucoheptulose
2-KLG	2-Keto-L-gulonsäure
Ac	Acetylschutzgruppe
ADP	Adenosindiphosphat
Äq	Äquivalente
<i>At</i> DHQS	DHQS von <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Av</i> DHQS	DHQS von <i>Anabaena variabilis</i>
COOH-7dSh	7-Desoxy-D-altro-heptulosonsäure
COSY	Homonukleare Korrelationspektroskopie
d	Tag
δ	chemische Verschiebung
DAHP	3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphat
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DBU	Diazabicycloundecen
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCM	Dichlormethan
DCPMU	1-(3,4-Dichlorphenyl)-3-methylharnstoff
DHQS	3-Dehydrochinat-Synthase
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC	EC-Klassifikationsnummer für Enzyme

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extracted ion Chromatogramm
ELSD	Lichtstreuendetektor
ESI	Elektrospray-Ionisation
FMN	Flavinmononukleotid
Gly-Gly	Glycyl-glycin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPA	Hydroxypyruvat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
iPr	Isopropyl
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
MeI	Methyliodid
MeOH	Methanol
MsCl	Methansulfonsäurechlorid
Mhz	Megahertz
MIC	Minimale Hemm-Konzentration
MPLC	Mitteldruckchromatographie
MSO	Murashige-Skoog-Medium
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
N	Äquivalentkonzentration
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

n.b.	nicht bestimmbar
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
n.s.	Nicht detektierbar
OD	optische Dichte
OMe	Methoxy-Gruppe
PEG400	Polyethylenglycol 400
Perac-7dSh	Peracetyl-7-desoxy-sedoheptulose
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ppm	parts per million
PVDF-Filter	Polyvinylidenfluorid-Filtzer
PDC	Pyridiniumdichromat
R _f	Retarding front / relate to front
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehung
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TEA	Triethylamin
Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v.l.n.r.	von links nach rechts
UV	Ultraviolettstrahlung
ZMBP	Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Stephanie Grond für die Möglichkeit meine Promotion, mit einem so spannenden und vielseitigen Thema, im AK anzufertigen. Vielen Dank für die Unterstützung in konstruktiven und motivierenden Gesprächen, sowie die Freiheiten in der Forschung die man im AK Grond erfährt.

Danken möchte ich auch Prof. Martin E. Maier, dass er die Zweitbetreuung dieser Arbeit übernommen hat.

Vielen Dank auch an Üner Kolukisaoglu und Marvin Braun, für die Arbeit an der gemeinsam veröffentlichenden Publikation, sowie für die Unterstützung zu den *in vivo* Untersuchungen an *A. thaliana*.

Dank geht auch an Nicolas Moitessier, Professor an der MCGILL University in Montreal, für die Bereitstellung und die Hilfe bei der Docking-Software FITTED.

Dank möchte ich auch aussprechen an alle Beteiligten des Glykobiotechnologie-Projektes. Prof. Karl Forchhammer für die konstruktiven Ideen bei den gemeinsamen Besprechungen. Johanna Rapp für die umfangreichen biologischen Untersuchungen, ohne die dieses Projekt nie so weit gekommen wäre, sowie die Unterstützung durch ihre hohe wissenschaftliche Expertise.

Danke Klaus für deine Hilfe deine cleveren Ideen, deine pragmatischen Ansätze und deine Persönlichkeit. Wir hatten immer sehr viel Spaß zusammen.

Selbstverständlich möchte ich auch dem kompletten AK Grond danken, sowohl ehemaligen als auch aktuelle Mitgliedern für die großartige gemeinsame Zeit: Vielen Dank an Zufl, Martin, Nadine, Doro, Philipp und Verena für die herzliche Aufnahme in den AK zum Start meiner damaligen Bachelorarbeit. Vielen Dank auch an die Leute, die den Leidensweg der Promotion gemeinsam mit mir gegangen sind: Vielen Dank an Sebastian, der den AK in einer weise belebt, wie es nur ein Düsseldorfer kann. Auch danke ich Juli für die großartige Zeit, die wir Gemeinsam in der Laborbox hatten, aber auch für den wissenschaftlichen Austausch. Vielen Dank auch an Taulant, Timm, Larissa, Julian, Patrik und Rhena für den Spaß im Laboralltag, als auch den Blödsinn bei den Kaffeepausen. Vielen Dank auch an Chema der das MaXis und alle anderen technischen Geräte im AK gepflegt hat und für seine spanische Kultur, die viel Freude in den AK gebracht hat, sowie an Ela, die mich tatkräftig bei den *in vivo* Untersuchungen an *A. thaliana* unterstützt hatte.

Zum Abschluss möchte ich meiner Familie Danken. Mehr Unterstützung und Hilfe kann man sich nicht wünschen, sowohl im Studium als auch in der Promotion. Danke Mama und Werner für euer grenzenloses Verständnis und eure bedingungslose Hilfe auf diesem Lebensabschnitt.

Vielen Dank auch dir Tamara, dass du diesen steinigen Weg mit mir gegangen bist und wir uns immer wieder gemeinsam motiviert hatten weiterzumachen, auch wenn es häufiger mal in der Forschung nicht so gut lief.

Literaturverzeichnis

- [1] FAO, *The future of food and agriculture – Trends and challenges*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Agricultural Development Economics Division (ESA), **2017**.
- [2] H. Krähmer, M. G. Hoffmann, T. Seitz, *Chem. Unserer Zeit* **2003**, *37*, 112-126.
- [3] E. Köhler, *Zeitschrift für Naturforschung C* **1979**, *34*, 895-899.
- [4] P. Kudsk, S. K. Mathiassen, *Weed Sci.* **2020**, *68*, 214-222.
- [5] E. F. S. Authority, *EFSA Journal* **2018**, *16*, e05348.
- [6] P. Kongtip, N. Nankongnab, R. Phupancharoensuk, C. Palarach, D. Sujirarat, S. Sangprasert, M. Sermsuk, N. Sawattrakool, S. R. Woskie, *J Agromedicine* **2017**, *22*, 282-289.
- [7] Durchführungsverordnung (EU) 2022/2364, **2022**.
- [8] J. S. Liu, W. C. Cheng, H. J. Wang, Y. C. Chen, W. C. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *373*, 1-7.
- [9] K. M. Herrmann, L. M. Weaver, *Annu. Rev. Plant Phys.* **1999**, *50*, 473-503.
- [10] P. D. Cole, J. A. Zebala, B. A. Kamen, *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **2005**, *2*, 337-342.
- [11] S. S. Chandran, J. W. Frost, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1493-1496.
- [12] C. E. Nichols, J. Ren, H. K. Lamb, A. R. Hawkins, D. K. Stammers, *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 129-144.
- [13] E. P. Carpenter, A. R. Hawkins, J. W. Frost, K. A. Brown, *Nature* **1998**, *394*, 299-302.
- [14] S. L. Bender, T. Widlanski, J. R. Knowles, *Biochemistry* **1989**, *28*, 7560-7572.
- [15] L. T. Piehler, J. L. Montchamp, J. W. Frost, C. J. Manly, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2423-2432.
- [16] L. Stryer, in *Biochemie*, 4 ed., Spektrum, **1996**, pp. 191-218.
- [17] B. T. Burlingham, T. S. Widlanski, *J. Chem. Educ.* **2003**, *80*, 214-218.
- [18] J. L. Montchamp, L. T. Piehler, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4453-4459.
- [19] S. Myrvold, L. M. Reimer, D. L. Pompliano, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1861-1866.
- [20] D. L. Pompliano, L. M. Reimer, S. Myrvold, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1866-1871.
- [21] J. L. Montchamp, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7645-7653.
- [22] N. Neetu, M. Katiki, A. Dev, S. Gaur, S. Tomar, P. Kumar, *J. Bacteriol.* **2020**, *202*.
- [23] B. Kowalska-Krochmal, R. Dudek-Wicher, *Pathogens* **2021**, *10*.
- [24] N. Y. Zhu, X. Wang, D. S. Li, Y. Lin, X. F. You, J. D. Jiang, Y. N. Xu, W. Jiang, S. Y. Si, *Sci. Rep.* **2018**, *8*.
- [25] M. A. Isa, R. S. Majumdar, S. Haider, *J. Mol. Model.* **2018**, *24*.
- [26] A. D. McNaught, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1919-2008.
- [27] P. M. Collins, *Dictionary of Carbohydrates*, 2 ed., **2006**.
- [28] A. Jacobsen, J. Thiem, *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 2833-2841.
- [29] W. C. Austin, *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, *52*, 2106-2112.
- [30] S. J. Angyal, in *Glycoscience: Epimerisation, Isomerisation and Rearrangement Reactions of Carbohydrates* (Ed.: A. E. Stütz), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2001**, pp. 1-14.
- [31] J. Cheng, Z. J. Fang, S. Li, B. H. Zheng, Y. H. Jiang, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 2093-2095.
- [32] D. Waschke, J. Thimm, J. Thiem, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3628-3631.
- [33] S. Muthana, H. Cao, X. Chen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 573-581.

- [34] H. J. M. Gijzen, L. Qiao, W. Fitz, C. H. Wong, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 443-473.
- [35] J. Piel, **2010**.
- [36] M. Bawn, F. Subrizi, G. J. Lye, T. D. Sheppard, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Tech.* **2018**, *116*, 16-22.
- [37] N. J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 527-531.
- [38] M. Lorilliere, C. Guerard-Helaine, T. Gefflaut, W. D. Fessner, P. Clapes, F. Charmantray, L. Hecquet, *Chemcatchem* **2020**, *12*, 812-817.
- [39] F. Charmantray, V. Helaine, B. Legeter, L. Hecquet, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *57*, 6-9.
- [40] A. Cazares, J. L. Galman, L. G. Crago, M. E. B. Smith, J. Strafford, L. Rios-Solis, G. J. Lye, P. A. Dalby, H. C. Hailes, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1301-1309.
- [41] K. G. Morris, M. E. B. Smith, N. J. Turner, M. D. Lilly, R. K. Mitra, J. M. Woodley, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2185-2188.
- [42] F. Dickens, D. H. Williamson, *Biochem. J.* **1958**, *68*, 74-81.
- [43] O. N. Solovjeva, M. V. Kovina, M. G. Zavialova, V. G. Zgoda, D. S. Shcherbinin, G. A. Kochetov, *Biosci. Rep.* **2020**, *40*, BSR20180246.
- [44] O. A. Esakova, L. E. Meshalkina, G. A. Kochetov, R. Golbik, *Biochem. (Mosc.)* **2009**, *74*, 1234-1238.
- [45] X. Sheng, Y. Liu, C. Liu, *J. Mol. Graph.* **2013**, *39*, 23-28.
- [46] G. A. Kochetov, O. N. Solovjeva, *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1844*, 1608-1618.
- [47] M. Prejanò, F. E. Medina, P. A. Fernandes, N. Russo, M. J. Ramos, T. Marino, *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 2881-2886.
- [48] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
- [49] J. E. Casida, *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30*, 1117-1126.
- [50] J. B. Zawilska, J. Wojcieszak, A. B. Olejniczak, *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65*, 1-14.
- [51] P. Jeschke, *Pest. Manag. Sci.* **2016**, *72*, 210-225.
- [52] D. Shaon Kumar, M. Irani, in *Insecticides* (Ed.: B. Ghousia), IntechOpen, Rijeka, **2018**, pp. 107-116.
- [53] J. de Ruyck, G. Brysbaert, R. Blossey, M. F. Lensink, *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* **2016**, *9*, 1-11.
- [54] X. Tao, Y. K. Huang, C. Wang, F. Chen, L. L. Yang, L. Ling, Z. M. Che, X. G. Chen, *Int. J. Food. Sci. Tech.* **2020**, *55*, 33-45.
- [55] K. Chaudhary, N. Mishra, *JSM Chemistry* **2016**, *4*, 1029.
- [56] G. Pujadas, M. Vaque, A. Ardevol, C. Blade, M. J. Salvado, M. Blay, J. Fernandez-Larrea, L. Arola, *Curr. Pharm. Anal.* **2008**, *4*, 1-19.
- [57] N. S. Pagadala, K. Syed, J. Tuszynski, *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 91-102.
- [58] F. Prieto-Martínez, M. Arciniega, J. Medina-Franco, *Tip rev. espec. cienc. quim.-biol.* **2018**, *21*.
- [59] X. Y. Meng, H. X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, *Curr. Comput.-Aided Drug Des.* **2011**, *7*, 146-157.
- [60] V. Salmaso, S. Moro, *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*.
- [61] C. R. Corbeil, P. Englebienne, N. Moitessier, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 435-449.
- [62] N. Moitessier, E. Therrien, S. Hanessian, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5885-5894.
- [63] D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, J. Bajorath, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 935-949.
- [64] E. Therrien, P. Englebienne, A. G. Arrowsmith, R. Mendoza-Sanchez, C. R. Corbeil, N. Weill, V. Campagna-Slater, N. Moitessier, *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 210-224.
- [65] N. Moitessier, *Forecaster Docking Tutorial*, Molecular Forecaster Inc., **2019**.

- [66] K. Brilisauer, J. Rapp, P. Rath, A. Schöllhorn, L. Bleul, E. Weiß, M. Stahl, S. Grond, K. Forchhammer, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 545.
- [67] N. Ezaki, T. Tsuruoka, T. Ito, T. Niida, *Sci. Rept. Meiji Seika Kaisha* **1970**, *11*, 15-20.
- [68] T. Ito, N. Ezaki, T. Tsuruoka, T. Niida, *Carbohydr. Res.* **1971**, *17*, 375-382.
- [69] T. Shomura, T. Niwa, S. Amano, J. Yoshida, C. Moriyama, T. Niida, *Sci. Rep. Meiji Seika Kaisha* **1970**, *11*, 21-25.
- [70] M. Schweizer, K. Brilisauer, R. Triebkorn, K. Forchhammer, H.-R. Köhler, *PeerJ* **2019**, *7*, e7094.
- [71] A. Lopalco, J. Douglas, N. Denora, V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 664-672.
- [72] Y. Kobori, D. C. Myles, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899-5907.
- [73] G. A. Sprenger, U. Schorken, G. Sprenger, H. Sahn, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 525-532.
- [74] J. Ceusters, C. Godts, D. Peshev, R. Vergauwen, N. Dyubankova, E. Lescrier, M. P. De Proft, W. Van den Ende, *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 1497-1507.
- [75] R. J. Herr, in *Modern Drug Synthesis*, **2010**, pp. 57-71.
- [76] P. Sairam, R. Puranik, B. Sreenivasa Rao, P. Veerabhadra Swamy, S. Chandra, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 303-306.
- [77] N. Mekala, M. V. R. K. Moturu, R. V. L. N. Dammalapati, A. R. Parimit, *Org. Process. Res. Dev.* **2016**, *20*, 609-614.
- [78] A. M. Downey, R. Pohl, J. Roithova, M. Hocek, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3910-3917.
- [79] L. A. Mtashobya, University of Southampton **2014**.
- [80] G. V. M. Sharma, T. A. Yadav, M. Choudhary, A. C. Kunwar, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 6834-6848.
- [81] N. Hussain, M. B. Tatina, D. Mukherjee, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 2666-2677.
- [82] V. U. Pawar, S. Ghosh, B. A. Chopade, V. S. Shinde, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7243-7245.
- [83] Z. L. Liu, S. F. Jenkinson, T. Vermaas, I. Adachi, M. R. Wormald, Y. Hata, Y. Kurashima, A. Kaji, C. Y. Yu, A. Kato, G. W. J. Fleet, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 4244-4258.
- [84] P. J. Card, *J. Carbohydr. Chem.* **1985**, *4*, 451-487.
- [85] A. B. Foster, R. Hems, J. M. Webber, *Carbohydr. Res.* **1967**, *5*, 292-301.
- [86] J. Rapp, Eberhard Karls Universität Tübingen **2021**.
- [87] S. R. Williams, H. D. Maynard, B. F. Chmelka, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1999**, *42*, 927-936.
- [88] C. J. Peng, X. H. Peng, H. M. Li, Y. Rong, X. Z. Dong, Y. F. Tai, *Asian J. Chem.* **2015**, *27*, 78-80.
- [89] V. I. Kim, E. V. Zakharova, I. V. Kozhevnikov, *React. Kinet. Catal. L.* **1991**, *45*, 271-276.
- [90] C. Brönnimann, T. Mallat, A. Baiker, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1995**, 1377-1378.
- [91] C. Brönnimann, Z. Bodnar, R. Aeschmann, T. Mallat, A. Baiker, *J. Catal.* **1996**, *161*, 720-729.
- [92] K. L. Williamson, M. U. Hasan, D. R. Clutter, *J. Magn. Reson.* **1978**, *30*, 367-383.
- [93] J. Rapp, B. Wagner, K. Brilisauer, K. Forchhammer, *Front. Microbiol.* **2021**, *12*.
- [94] D. Wahler, O. Boujard, F. Lefèvre, J.-L. Reymond, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 703-710.
- [95] F. W. Lichtenthaler, J. Klotz, F.-J. Flath, *Liebigs Ann.* **1995**, 2069-2080.
- [96] W. A. Bubb, *Concepts Magn. Reson. A: Bridg. Educ. Res.* **2003**, *19A*, 1-19.
- [97] A. D. French, M. K. Dowd, *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 561-570.
- [98] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
- [99] M. Karplus, *Chem. Phys.* **2004**, *30*, 11-15.
- [100] S. J. Angyal, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1969**, *8*, 157-226.

- [101] B. Coxon, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2009**, *62*, 17-82.
- [102] K. Grossmann, R. Berghaus, G. Retzlaff, *Pestic. Sci.* **1992**, *35*, 283-289.
- [103] K. Grossmann, *Pest. Manag. Sci.* **2005**, *61*, 423-431.
- [104] F. Tian, J. L. Montchamp, J. W. Frost, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7373-7381.
- [105] G. Mittelstadt, L. Negron, L. R. Schofield, K. Marsh, E. J. Parker, *Arch. Biochem. Biophys.* **2013**, *537*, 185-191.
- [106] P. Rath, J. Rapp, K. Brilisauer, M. Braun, Ü. Kolukisaoglu, K. Forchhammer, S. Grond, *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202200241.
- [107] J. L. Montchamp, L. T. Piehler, T. J. Tolbert, J. W. Frost, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1349-1352.
- [108] J. L. Montchamp, J. R. Peng, J. W. Frost, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6999-7007.
- [109] A. Jalal, J. C. de Oliveira, J. S. Ribeiro, G. C. Fernandes, G. G. Mariano, V. D. R. Trindade, A. R. dos Reis, *Ecotox. Environ. Safe.* **2021**, *207*.
- [110] J. Rapp, P. Rath, J. Kilian, K. Brilisauer, S. Grond, K. Forchhammer, *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100621.
- [111] J. L. Montchamp, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6296-6298.