

Synthese und Test von Inhibitoren der Neutralen Sphingomyelinase

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
Von der Fakultät für Chemie
der Universität Karlsruhe (TH)
angenommene

DISSERTATION

von
Diplom-Chemiker
Christoph Arenz
aus Aachen

Dekan: Prof. Dr. M. Ballauf

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Giannis

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Rétey

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2000

für Bahareh

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1997 bis März 1998 an der Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität, Bonn und von März 1998 bis September 2000 an der Universität Karlsruhe (TH) durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Giannis danke ich sehr herzlich für die aktuelle und interessante Themenstellung und seine engagierte und stets motivierende Betreuung dieser Arbeit, die immer auch über das rein Wissenschaftliche hinaus ging.

Dem Korefferten danke ich für die Übernahme des Korefferates.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für die Gewährung eines Stipendiums nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz.

Besonders danke ich den Mitgliedern des Arbeitskreises, Michael Karle, sowie Peer Nils Schröder und Dr. Antje Stanjek, für die erste Zeit in Karlsruhe. Den später hinzugekommenen, Elisabeth Addicks, Ralph Mazitscheck, Axel Huwe, Samy Al-Rawi, Oliver Heinzerling, Holger Bauer, Markus Biel, Stephanie Mohr, Silvia Neumann, Patrick Baumhof, Veit Wascholowski, Simon Horst, Michael Gartner, Marcel Mülbaier und Simon Ficht danke ich ebenfalls für das freundschaftliche Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. K. Sandhoff danke ich für die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Geräten. Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Sandhoff, insbesondere Dr. Christina Schütte, Silke Hüttler, Stefan Hepeldickler und Frau H. Moczall danke ich für zahlreiche Diskussionen über die Enzympräparationen und den N-SMase Assay.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. J. Rétey für die freundliche Bereitstellung zahlreicher Geräte, den Mitarbeitern des Arbeitskreises Rétey danke ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre insbesondere im Isotopenlabor und in der Zellkultur.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Altenbach und Dr. Oliver Block, Wuppertal, danke ich für die freundliche Bereitstellung der Manumycin A - Analoga, Herrn Prof. Dr. H. Waldmann und Michael Thutewohl, danke ich für zahlreiche Diskussionen und gute Zusammenarbeit. Herrn Dr. M. Morr, Braunschweig, danke ich für die Überlassung der TMDS.

Ein Dankeschön möchte ich auch den Damen und Herren aus der analytischen Abteilung, den Werkstätten und der Glasbläserei Frau Kuiper, Frau Lang, Frau Kernert, Frau Roßnagel, Herrn Dr. Röttele, Herrn Dr. Foitzik und Herrn Lagler aussprechen.

Veit Wascholowski danke ich für die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mich während des ganzen Studiums mit Rat und Tat unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	4
2.1 DIE SPHINGOLIPID BIOSYNTHESE.....	4
2.1.1 <i>Inhibitoren der Sphingolipid Biosynthese</i>	7
2.2 DER ABBAU DER SPHINGOLIPIDE	7
2.2.1 <i>Sphingolipid Speicherkrankheiten</i>	8
2.2.1.1 Das Rest-Enzymaktivitäts Modell	9
2.3 SPHINGOLIPIDE IN DER SIGNALTRANSDUKTION	10
2.3.1 <i>Der Sphingosin-1-phosphat Rezeptor EDG-1</i>	11
2.3.2 <i>Ceramid als second messenger</i>	12
2.3.2.1 Ceramid und Krebs	14
2.4 DIE SAURE SPHINGOMYELINASE.....	15
2.4.1 <i>Die Niemann-Pick'sche Erkrankung</i>	16
2.4.2 <i>Inhibitoren der Sauren Sphingomyelinase</i>	17
2.5 DIE NEUTRALE SPHINGOMYELINASE.....	18
2.5.1 <i>Inhibitoren der Neutralen Sphingomyelinase</i>	19
2.5.1.1 Frühe Arbeiten	19
2.5.1.2 Inhibition der N-SMase durch Glutathion.....	20
2.5.1.3 Scyphostatin.....	21
2.5.1.4 Alutenusin und Macquarimicin A.....	22
2.5.1.5 Die Hydrochinone F-11334s.....	23
2.6 AUFGABENSTELLUNG.....	23
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	24
3.1 ETABLIERUNG DES N-SMASE UND A-SMASE TESTSYSTEMS	24
3.1.1 <i>Identifizierung von irreversiblen SMase-Inhibitoren</i>	25
3.1.2 <i>Test von Ceramid-C- und -N-Analoga als potentielle SMase Inhibitoren</i>	27
3.2 SYNTHESE UND ENZYMATISCHER TEST DES SPIROEPOXIDS 30	27
3.2.1 <i>Synthese der Verbindung 30</i>	27

3.2.2 Die Selektive Inhibition der N-SMase durch das Spiroepoxid 30	29
3.2.3 Möglicher Mechanismus der N-SMase Inhibition durch die Verbindung 30.....	32
3.2.4 Synthese und enzymatischer Test des Epoxids 32.....	32
3.2.5 Synthese des Spiroepoxids 30, ausgehend von Boc-D-Serin – eine Alternative.....	34
3.3 SYNTHESE UND ENZYMATISCHER TEST DER CERAMID-S-ANALOGA 37-39	35
3.4 VERSUCHE ZUR SYNTHESE EINES KONFORMATIV FIXIERTEN SCYPHOSTATIN-ANALOGONS	37
3.5 IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MANUMYCIN A UND ANALOGA ALS SELEKTIVE INHIBITOREN DER NEUTRALEN SPHINGOMYELINASE.....	39
3.6 SYNTHESE DER MICHAEL-AKZEPTOREN 54 A UND 54 B ALS POTENTIELLE N-SMASE INHIBITOREN	42
3.7 SYNTHESE DES SALICYLSÄURE-DERIVATS 59.....	43
3.8 SYNTHESE VON POTENTIELLEN INHIBITOREN DER N-ACETYLNEURAMINSÄURE- BIOSYNTHESE	45
4 AUSBLICK.....	47
5. EXPERIMENTELLER TEIL.....	49
5.1 SYNTHETISCHE ARBEITEN	49
5.1.1 Allgemeine Angaben:	49
5.1.2 Experimentelle Vorschriften:.....	50
5.1.2.1 Synthese von N-Decanoyl-D-serin 25.....	50
5.1.2.2 Synthese des Epoxids 32	58
5.1.2.3 Synthese der Ceramid-S-Analoga 37-39	68
5.1.2.4 Synthese des Lactams 45.....	77
5.1.2.5 Synthese der Michael-Akzeptoren.....	82
5.1.2.6 Synthese der 6-Amino-Glc-NAc Derivate 64 a und 64 b.....	88
5.2 BIOCHEMISCHE ARBEITEN.....	99
5.2.1 Allgemeine Angaben.....	99
5.2.2 Geräte und Materialien.....	100
5.2.3 Präparation von Mikrosomen mit N-SMase und A-SMase Aktivität aus Rattenhirn	101

5.2.3.1 Puffer und Lösungen	101
5.2.3.2 Präparation und Homogenisation von Rattenhirnen	101
5.2.3.3 Aufarbeitung des Rattenhirn Roh-Homogenats.....	102
5.2.3.4 Chromatographischer Reinigungsschritt	102
5.2.4 <i>Der Sphingomyelinase Assay</i>	104
5.2.4.1 Puffer und Lösungen	104
5.2.4.2 Die Assay Durchführung	105
6 LITERATUR.....	106

Abkürzungsverzeichnis

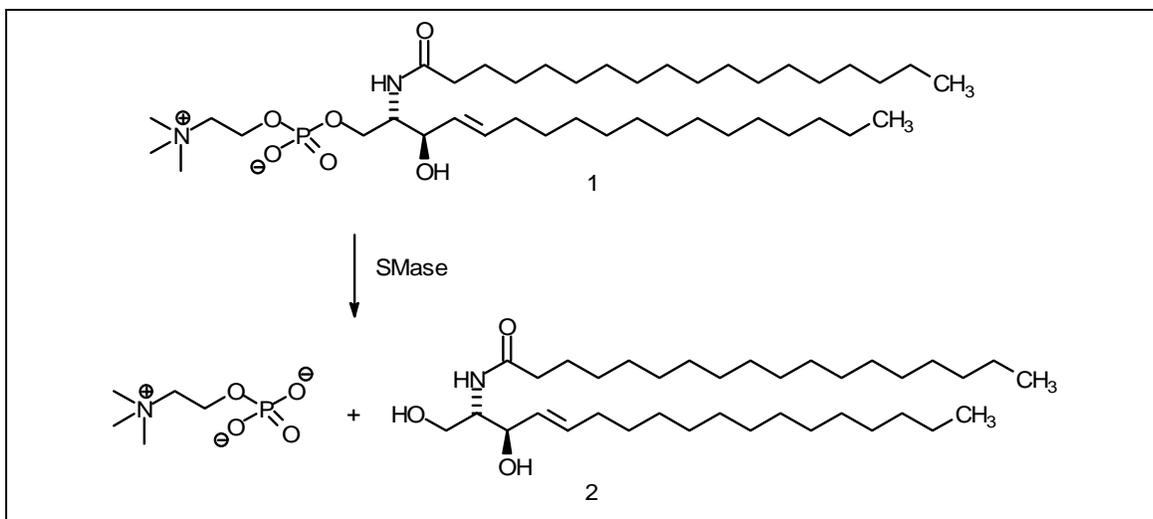
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
aq.	aquatisch, wäßrig
ber.	berechnet
bidest.	bidestilliert
Bn	Benzyl
Boc	tertiär Butyloxycarbonyl
Bu	Butyl
Cer	Ceramid
cpm	counts per minute
d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dest.	destilliert
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EI	Elektro-Ionisierung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Et	Ethyl
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Glc	Glukose
Glc-Cer	Glukosylceramid
h	Stunde(n)
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high performance liquid chromatography
HR	Hochauflösend
Kap.	Kapitel
konz.	konzentriert
LM	Lösungsmittel

Lsg.	Lösung
Man	Mannose
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspin-Resonanz
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
rpm	rotations per minute
SM	Sphingomyelin
SMase	Sphingomyelinase
Smp.	Schmelzpunkt
<i>t., tert.</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TNF	tumor necrosis factor
Tos	Tosyl
Upm	Umdrehungen pro Minute

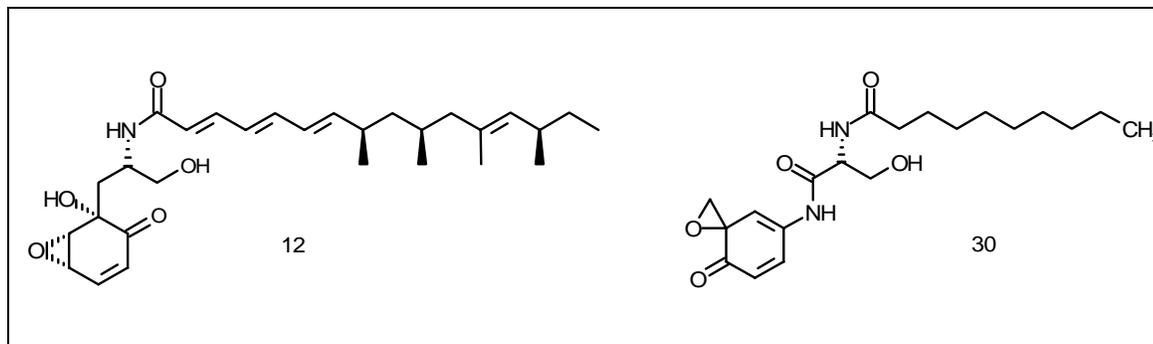
1. Zusammenfassung

Sphingomyelin 1 ist ein ubiquitärer Membranbaustein, der in Säugetierzellen je nach Zell-Typ bis zu 25 Prozent der Masse der Membran-Lipide ausmacht.^[1] Die Kataboliten des Sphingomyelins, sind wegen ihrer vielfältigen biologischen Wirkungen und wegen ihrer möglichen Funktion als second messenger in den Mittelpunkt intensiver Forschung gerückt. Der primäre Sphingomyelin-Katabolit Ceramid 2 entsteht im sogenannten Sphingomyelinzyklus ^[2] durch die Aktion entweder einer lysosomalen sauren Sphingomyelinase (A-SMase) oder einer membranständigen neutralen Sphingomyelinase (N-SMase). Ihm wird eine entscheidende Rolle in der Zellregulation, bei der Steuerung von entzündlichen Prozessen, sowie beim programmierten Zelltod (Apoptose) zugesprochen.^[3-5] Zahlreiche Aspekte der Ceramid-vermittelten Signaltransduktion sind jedoch umstritten ^[6-10] und auch die Frage, welche Sphingomyelinase für die Stimulus-induzierte Ceramid Produktion jeweils zuständig ist, wird kontrovers diskutiert.^[5, 11] Der membranständigen N-SMase, die einer physiologischen Regulation durch Substanzen wie Glutathion ^[12, 13] und Arachidonsäure ^[14] unterliegt, wird eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion beigemessen. Selektive Inhibitoren der verschiedenen Sphingomyelinase Typen können zu einem besseren Verständnis sowohl der Rolle dieser Enzyme als auch der biologischen Bedeutung des Ceramids bei der Signaltransduktion beitragen.

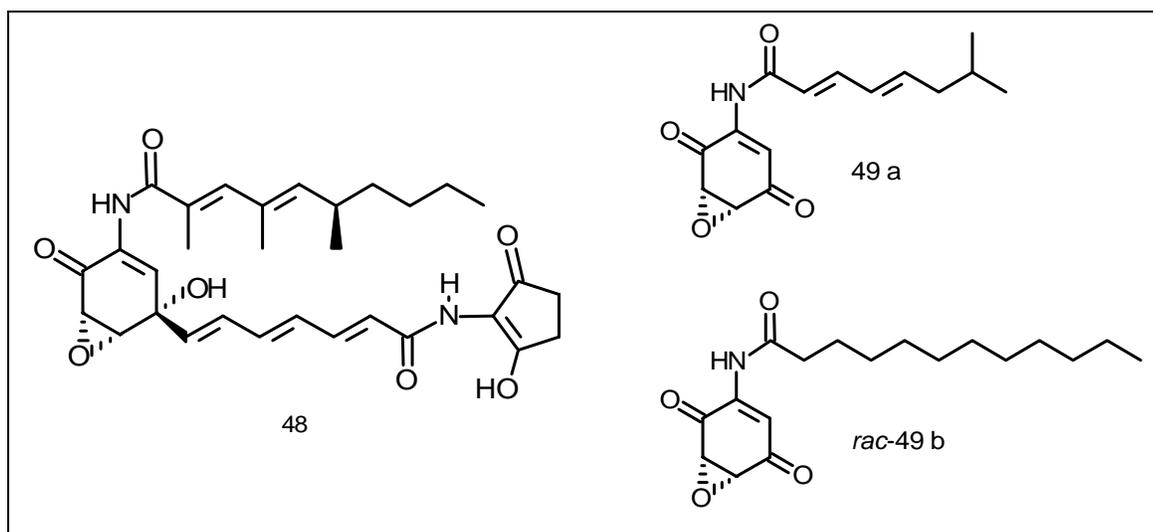
Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Präparation von Mikrosomen aus Rattenhirn eine Quelle für Säugetier- N-SMase und A-SMase erschlossen und ein Assay für die Identifizierung und Charakterisierung von SMase Inhibitoren etabliert.



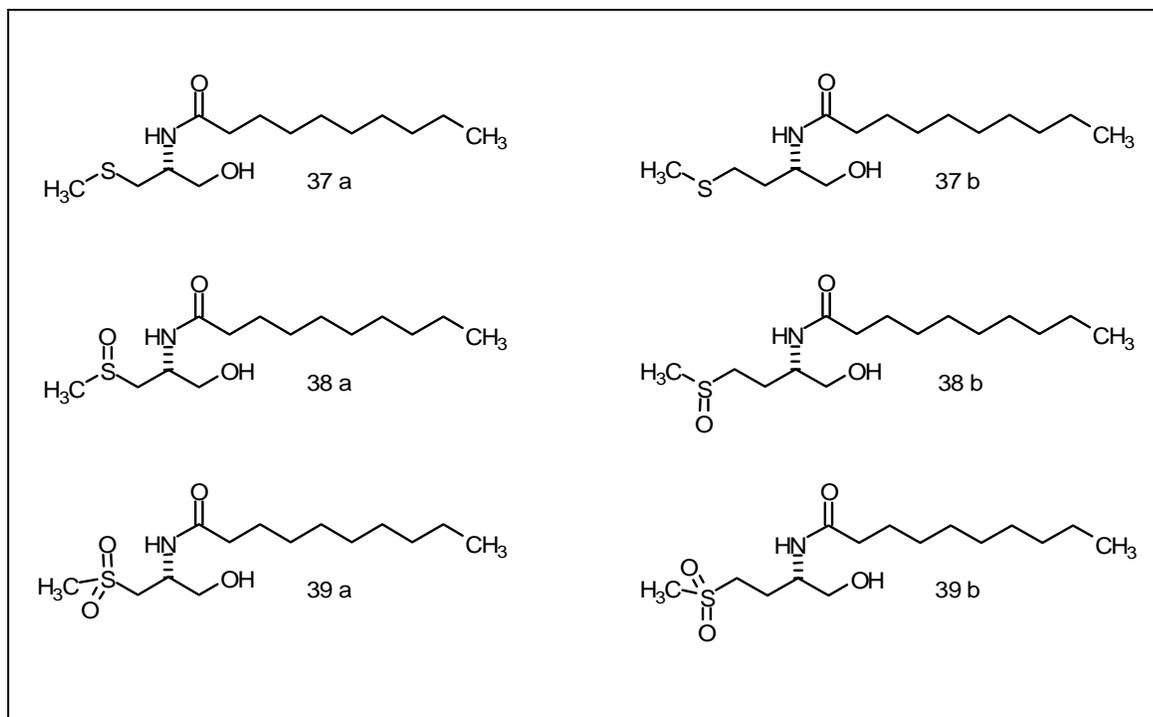
Der kürzlich als N-SMase Inhibitor identifizierte Naturstoff Scyphostatin 12 [15, 16] diene als Leitstruktur für die Synthese des Spiroepoxid 30. Mit der Darstellung von 30 gelang die Synthese des ersten selektiven und irreversiblen Inhibitors der N-SMase.[17]



Darüber hinaus konnte der vor allem als Ras-Farnesyltransferase-Inhibitor bekannte Naturstoff Manumycin A 48 ebenfalls als selektiver irreversibler Inhibitor der N-SMase identifiziert werden.[18] Enzymatische Untersuchungen mit einigen einfachen Analoga von Manumycin A zeigten, daß die Verbindungen 49 a und *rac*-49 b ebenfalls selektive Inhibitoren der N-SMase darstellen. Die Verbindung 49 a ist der bisher potenteste irreversible Inhibitor der N-SMase und erscheint als besonders geeignet, die N-SMase an ihrem aktiven Zentrum zu markieren. Die deutlich potentere Inhibition der N-SMase durch 49 a im Vergleich zu dem Derivat mit einer gesättigten lipophilen Seitenkette ist zudem richtungsweisend für die Entwicklung weiterer N-SMase Inhibitoren.

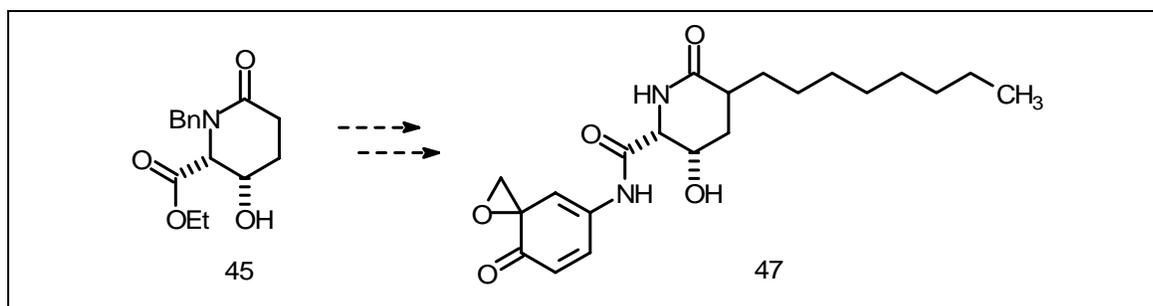


Auf der Suche nach Inhibitoren, die nach einem kompetitiven Inhibitionsmuster wirken und ein vielversprechendes Potential als anti-inflammatorische Wirkstoffe besitzen, wurden u.a. die Ceramid-S-Analoga 37-39 synthetisiert. Die Substanzen 37 a, 38 a und 39 a wurden als moderate selektive N-SMase Inhibitoren identifiziert.



Des weiteren wurde eine alternative Synthese für das Spiroepoxid 30, ausgehend von *Boc*-geschütztem D-Serin, etabliert, die den Einsatz einer großen Anzahl verschiedener Fettsäuren und Anilin Derivate erlaubt. Diese Synthese ist prinzipiell dafür geeignet, an fester Phase durchgeführt zu werden, da das D-Serin über die freie Hydroxy-Funktion und geeignete Spacer an ein Polymer gebunden werden kann.

Mit der Synthese des Lactams 45 als cyclisches D-Serin-Analogon wurde ein Intermediat für die Entwicklung konformativ-fixierter N-SMase Inhibitoren dargestellt.



2. Einleitung

Dem deutschen Arzt Tudichum gelang in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts bei fraktionierenden Kristallisationen von alkoholischen Hirnextrakten Verbindungen zu isolieren, die neben Zucker und Fettsäuren eine organische Base enthielten.^[19] Da diese Base ihm rätselhaft erschien, gab er dieser Substanz in Anlehnung an die griechische Sage von der Sphinx den Namen Sphingosin.

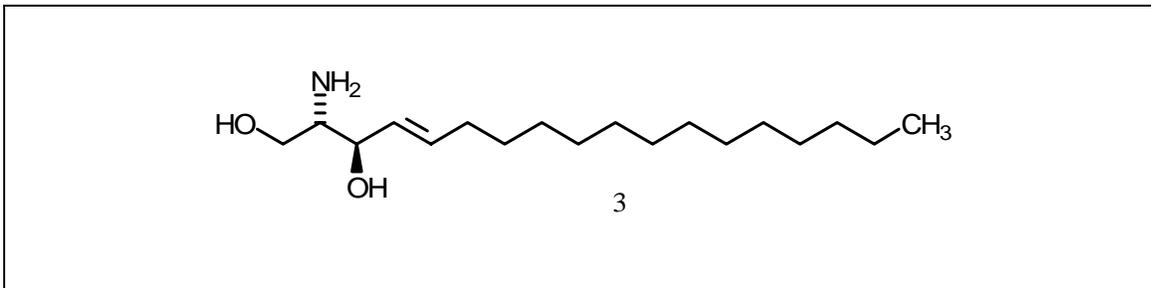


Abb. 1: *D-erythro*-Sphingosin 3

Heute versteht man unter Sphingosin einen Aminodialkohol 3, welcher das Rückgrat der Sphingolipide bildet. Sphingosin ist meist über den Stickstoff mit einer längeren Fettsäure acyliert. Das resultierende Ceramid 2 ist der größte gemeinsame Baustein fast aller höheren Sphingolipide in Vertebraten. Ceramid ist zumeist über die 1'-OH Funktion glykosidisch mit Kohlenhydratresten verknüpft, und je nach Art der Kohlenhydrate gibt es verschiedene Reihen von Glykosphingolipiden. Ceramid kommt auch, mit Phosphorylcholin verestert, in Form von Sphingomyelin 1 vor.

2.1 Die Sphingolipid Biosynthese

Sphingomyelin und die Glykosphingolipide (GSL) sind wichtige Bausteine von eukaryontischen Plasmamembranen und sind meist auf deren äußeren Seite zu finden. Die auf der Zelloberfläche ausgeprägten GSL Muster sind charakteristisch für den Zell-Typ und das Entwicklungsstadium einer Zelle. Die GSL, welche die Zelle mit ihren Kohlenhydrat-Anteilen nach außen hin umgeben, fungieren als Kontakt- und Erkennungsstrukturen und spielen bei der Entwicklung von Organen ^[20] und auch bei der Wasser-Permeabilitätsbarriere der Haut ^[21, 22] eine wichtige Rolle.

Da die Sphingolipide in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten synthetisiert und abgebaut werden, werden ihre Vorstufen auch in intrazellulären Membranen nachgewiesen.

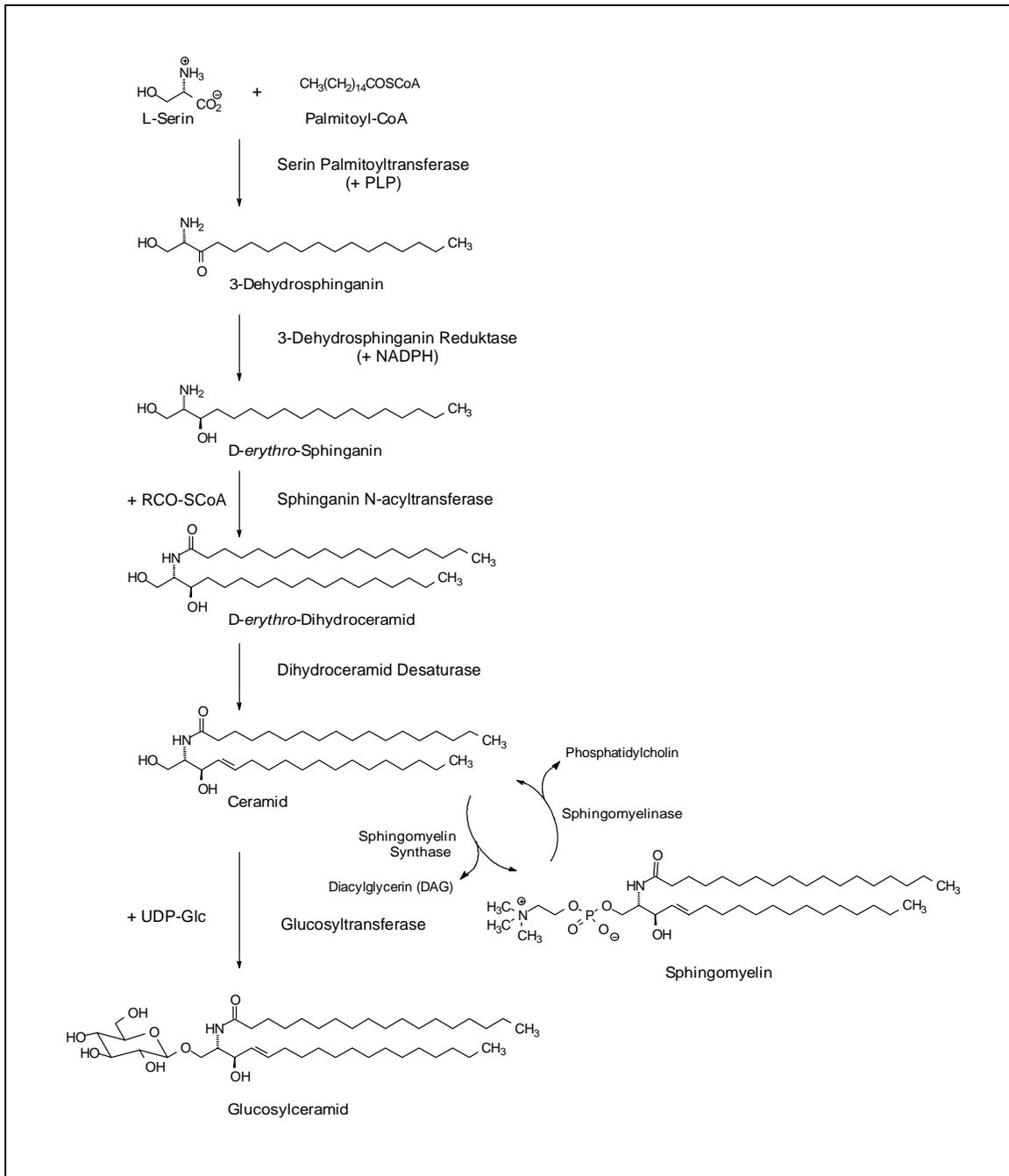


Abb. 2: Sphingolipid-Biosynthese

Die Biosynthese und auch der Abbau der Sphingolipide sowie ihr intrazellulärer vesikulärer Transport sind regulierte und aufeinander abgestimmte Prozesse, in denen die intrazellulären Membranen über Prozesse der Membranfusion mit der Plasmamembran in Verbindung stehen. Die Enzyme der Sphingolipid-Biosynthese sind allesamt Membran-gebundene Enzyme, von denen nur die Serin-Palmitoyltransferase (SPT) weitgehend durch Sequenzdaten und mechanistische Studien charakterisiert ist. Die SPT ist das Schrittmacher-Enzym der

Sphingolipid Biosynthese und katalysiert die Reaktion von L-Serin mit vorzugsweise Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphinganin (Abb. 2).

Im nächsten Schritt wird 3-Ketosphinganin durch die 3-Ketosphinganin-Reduktase mit Hilfe von NADPH als Cofaktor zu *D-erythro*-Sphinganin reduziert. Anschließend acyliert die Sphinganin-*N*-Acyltransferase Sphinganin zu Dihydroceramid. Dieses Enzym ist auch in der Lage beim Sphingolipid Abbau anfallendes Sphingosin zu acylieren und weist eine Selektivität für Coenzym A aktivierte Stearinsäure auf. Dihydroceramid, letztendlich, wird durch die Dihydroceramid-Desaturase zu Ceramid dehydriert. Sphingosin ist also, anders als lange Zeit angenommen, kein Intermediat der Ceramid-Biosynthese, es kann aber über einen „*salvage pathway*“ in die Ceramid-Synthese einfließen (s. Abb. 3).

Während die Ceramid Biosynthese vollständig an der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) abläuft, geschieht die Synthese von Sphingomyelin und Glykosphingolipiden im Lumen des Golgi-Apparates (Abb. 3).

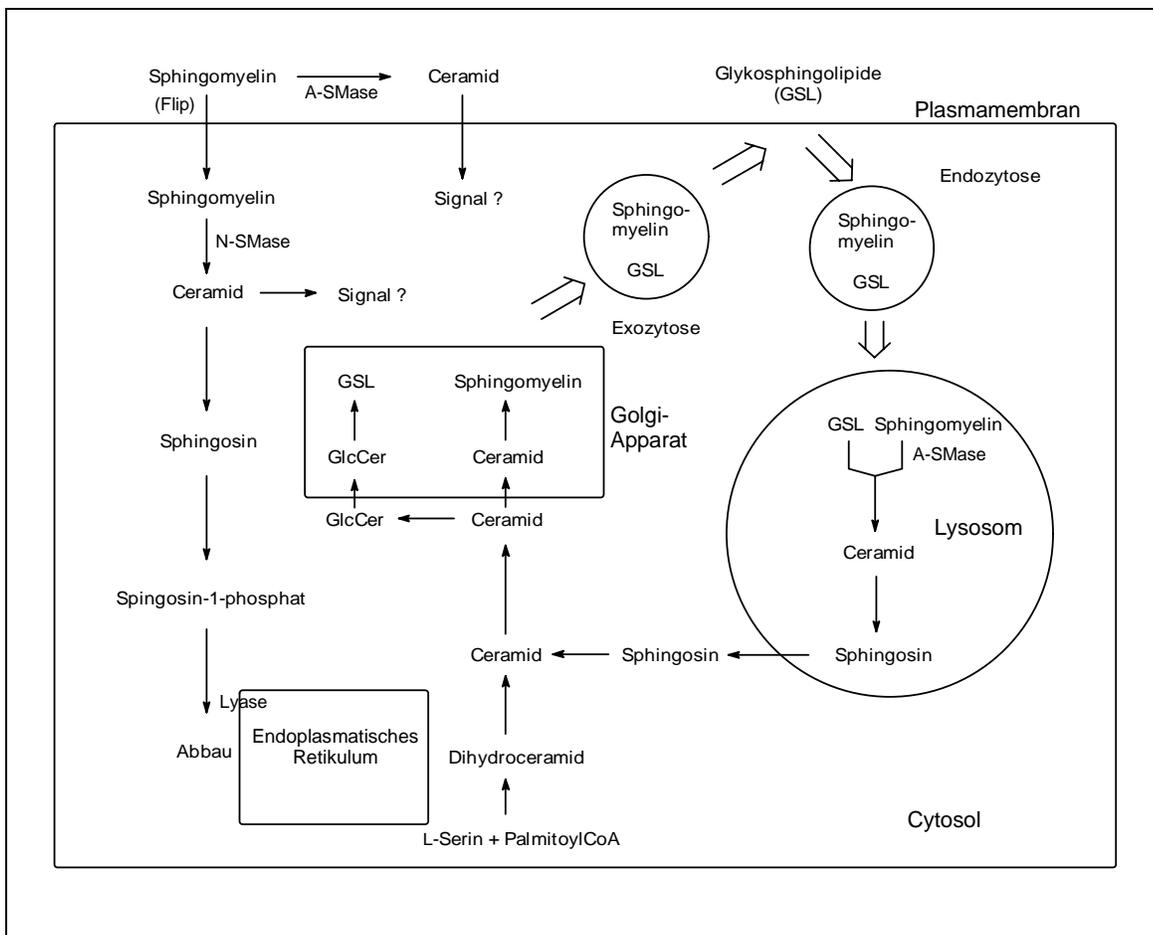


Abb. 3: Zelluläre Topologie des Sphingolipid-Metabolismus, abgewandelt nach Lit.[5]

Allein Glukosylceramid wird auf der cytosolischen Seite des Golgi-Apparates gebildet, was jedoch eine bisher noch nicht gefundene „Flipase“ impliziert, welche die Membrantranslokation bewerkstelligt. Im Lumen des Golgi-Apparates wird Ceramid durch die Sphingomyelin Synthase zu Sphingomyelin oder Glukosylceramid zu den höheren GSL, insbesondere zu den Gangliosiden, umgewandelt. Der Aufbau der GSL geschieht dann weiter vom nicht-reduzierenden Ende der Kohlenhydrate her, indem jeweils monomere Zuckerbausteine auf das entsprechende GSL übertragen werden. Sulfatide und Cerebroside werden ebenfalls im Lumen des Golgi Apparates synthetisiert.

Es wird vermutet, daß die Biosynthese des Sphingomyelins auch an alternativen Orten abläuft. Die Bildung von GSL mit hydroxylierten Fettsäureresten hingegen scheint im Lumen des ER abzulaufen.

2.1.1 Inhibitoren der Sphingolipid Biosynthese

Inhibitoren der Sphingolipid Biosynthese sind, angefangen bei Inhibitoren der SPT, für fast alle Schritte bis zur Bildung des Glukosylceramid (Glc-Cer) bekannt.^[23] Solche Inhibitoren sind nützlich, um durch Ausschaltexperimente die Funktion bestimmter Sphingolipide zu analysieren, da es „flußabwärts“ des gehemmten Enzyms zu einer Verarmung der Sphingolipid Mediatoren und „flußaufwärts“ meist zu einer Akkumulation von Sphingolipiden kommt.

Inhibitoren der Sphingolipid Biosynthese sind auch pharmakologisch interessant, da sie prinzipiell als Immunsuppressiva,^[24] Antimalaria-Mittel,^[25] oder als Medikamente zur Behandlung der Sphingolipidosen ^[26] geeignet erscheinen.

2.2 Der Abbau der Sphingolipide

Der Abbau der GSL und des Sphingomyelins vollzieht sich in den sauren Kompartimenten der Zelle, den späten Endosomen und insbesondere in den Lysosomen (Abb. 3).

Sphingomyelin und die GSL gelangen nach Einstülpung und Einschnürung von Bereichen der Plasmamembran in Form von „*coated pits*“ in die frühen Endosomen, mit deren Membranen sie verschmelzen. Nach einem älteren Modell kommt es dann im Endosom bzw. im Lysosom,

wo Sphingomyelin und die GSL dann als integrale Bestandteile auf der Innenseite der Membran lokalisiert sind zum Abbau durch die endosomalen- und lysosomalen Enzyme.

Da die Endosomen und Lysosomen durch eine besonders dichte Glykocalyx vor Selbstverdau geschützt sind, erscheint dieser Mechanismus wenig plausibel. Ein von *Sandhoff et al.* vorgeschlagenes Modell stützt sich darauf, daß die *coated pits* nach Verschmelzung mit der endosomalen Membran wieder abgeschnürt werden, und die Sphingolipide an den Außenseiten der *coated pits* im Endosom bzw. Lysosom abgebaut werden.^[27]

Bei den Glykosphingolipiden, deren Kohlenhydrat-Reste sequentiell vom nicht-reduzierenden Ende her abgespalten werden, werden die abbauenden Enzyme, die Hexosaminidasen, von Sphingolipid Aktivator Proteinen (SAPs) unterstützt. Im Fall des G_{M2} -Aktivators nimmt man an, daß dieser als „Liftase“ wirkt, und das Sphingolipid G_{M2} aus der Membran hebt, und es so für einen Abbau durch die Hexosaminidase B zugänglich macht.^[28]

2.2.1 Sphingolipid Speicherkrankheiten

Der lysosomale Abbau von Sphingolipiden ist mit dem Auftreten verschiedener Erbkrankheiten verbunden.^[5] Die erbliche Störung von einem oder mehreren Abbauschritten führt zur Akkumulation von Sphingolipiden, die nicht mehr abgebaut werden können und zum Auftreten lysosomaler Speicherkrankheiten (Sphingolipidosen), die nach der Art der Speichersubstanz klassifiziert werden. Ursache für die Akkumulation von Sphingolipid-Intermediaten kann der Defekt eines Enzyms, aber auch eines Transport- oder Aktivatorproteins sein.

Die erste bekannt gewordene und eingehend charakterisierte Sphingolipidose ist die Tay-Sachs Erkrankung. Diese wurde erstmals 1881 von *Warren Tay* als „infantile amaurotische Idiotie“ beschrieben, die sich durch Blindheit (kirschroter Fleck hinter der Retina), verlangsamtes Wachstum, motorische Störungen und einen vergrößerten Kopf äußert, und im Alter von 3-5 Jahren zum Tod des Patienten führt. Der Neurologe *Bernard Sachs* bemerkte das aufgeblähte Zytoplasma in den Neuronen solcher Patienten und erkannte außerdem die relativ weite Verbreitung der Krankheit in der jüdischen Bevölkerung und prägte den Begriff „familiäre amaurotische Idiotie“. Später gelang es verschiedenen Wissenschaftlern, die vergrößerten Neuronen auf eine Speicherung des Gangliosids G_{M2} zurückzuführen.

Abhängig von den verschiedenen Gendefekten, die eine Speicherung von G_{M2} zur Folge haben, sind mehrere Subtypen bzw. Varianten der Tay-Sachs Krankheit bekannt.

Man kennt heute fast für jeden lysosomalen Abbauschritt eine erblich bedingte Speicherkrankheit. Für einige Krankheiten sind die defekten Gene identifiziert und kloniert worden, und es stehen Maus Modelle, die diesen verschiedenen Krankheiten entsprechen, zur Verfügung.^[29]

Die im Vergleich zu anderen Stoffwechselwegen auffällige Häufung von erblich bedingten Erkrankungen ist wahrscheinlich in dem streng sequentiellen Abbau der Glykosphingolipide und dem Fehlen von alternativen Stoffwechselwegen begründet.^[1]

2.2.1.1 Das Rest-Enzymaktivitäts Modell

Die Sphingolipidosen sind durch eine auffallende Heterogenität der klinischen Krankheitsbilder gekennzeichnet. So sind von den meisten Sphingolipid-Speicherkrankheiten, die durch die Speicherung eines bestimmten Sphingolipids definiert sind, zahlreiche Typen bekannt. So führt die Tay-Sachs Krankheit z.B. im Allgemeinen im dritten bis fünften Lebensjahr, nach vorangegangener Demenz, Blindheit und Lähmung zum Tod.^[29]

Es sind jedoch auch juvenile und adulte Formen der Tay-Sachs'schen Erkrankung bekannt, die molekulare Ursache ist jedoch in allen drei Fällen ein Defekt der Hexosaminidase. Das Rest-Enzymaktivitäts Modell gibt eine für die meisten Sphingolipidosen passende Erklärung hierfür.

Die Rest-Enzymaktivität beruht darauf, daß das mutierte katabole Enzym seine katalytischen Fähigkeiten nicht ganz eingebüßt hat, sondern Aufgrund der Mutation veränderte kinetische Daten wie K_m und V_{max} aufweist. Zu einer Speicherung von (Glyko-)Sphingolipiden im Lysosom kommt es nur dann, wenn die Geschwindigkeit des Einstroms von Substrat in das Lysosom höher ist, als die Geschwindigkeit des Abbaus (V_{max}) durch das betreffende Enzym. In den juvenilen und adulten Formen der Sphingolipidosen ist soviel Rest-Enzymaktivität vorhanden, daß die Speicherung von Sphingolipiden in den Lysosomen sehr langsam vor sich geht. Dieses Modell erklärt auch, warum sich die lysosomale Speicherung von Sphingolipiden nur in solchen Organen der Patienten nachweisen läßt, in denen das jeweilige Sphingolipid besonders stark exprimiert ist.

Es gibt bereits experimentelle Ansätze einer „*substrate deprivation therapy*“ mit dem Ziel, durch Inhibitoren der Glykosphingolipid-Biosynthese, wie z.B. *N*-Butyldeoxynojirimycin (NBDNJ) 4, *D-threo*-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinyl-propan-1-ol (*D-threo*-PDMP) 5, oder das im Arbeitskreis *Giannis* hergestellte 1-Methylsulfanyldihydroceramid (MSDH-

Cer) 6 (s. Abb. 4) [30-32] eine Verbesserung der Krankheitssymptome von Sphingolipidose-Patienten mit nennenswerter Rest-Enzymaktivität zu erreichen.[26]

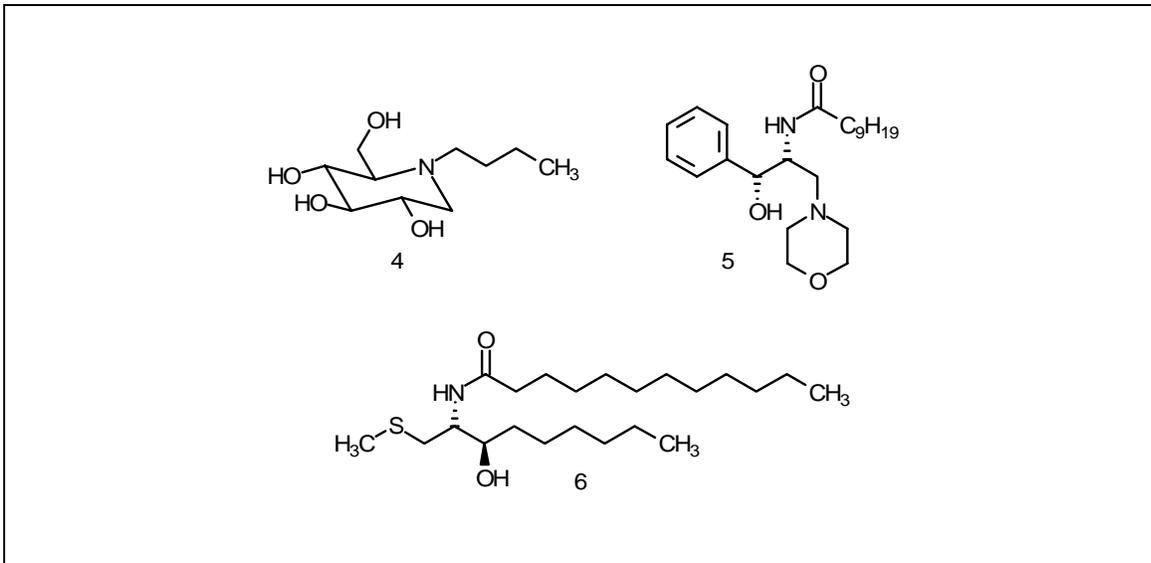


Abb. 4: Inhibitoren der Glykosphingolipid-Biosynthese

2.3 Sphingolipide in der Signaltransduktion

Seit einiger Zeit gelten die Kataboliten des Sphingomyelins 1, Ceramid 2, Sphingosin 3, und Sphingosin-1-Phosphat 7 als Signalmoleküle bzw. *second messenger* und zahlreiche Veröffentlichungen befassen sich mit der Art ihrer Bildung, und ihrer Rolle für die Regulation zellulärer Vorgänge. Ausgangspunkt für diese Entwicklung war die Beobachtung, daß die Proteinkinase C (PKC), ein Signalmolekül, welches durch den Lipid-Botenstoff Diacylglycerin (DAG) aktiviert wird, durch Sphingosin gehemmt wird.[33]

Ceramid, der primäre Katabolit des Sphingomyelins, kann nicht nur durch verschiedene Sphingomyelinasen freigesetzt werden, sondern auch im Zuge der *de novo* Synthese von Sphingolipiden, bzw. beim Lysosomalen Abbau der GSL. Da Sphingomyelin jedoch in großen Mengen in der Plasmamembran vorkommt, und nur ein Schritt zur Bildung von Ceramid nötig ist, geht man davon aus, daß vor allem die Sphingomyelinasen für eine schnelle Ceramid Freisetzung im Rahmen von Signaltransduktions-Prozessen von Bedeutung sind.

Die Signalmoleküle Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) werden aus Ceramid durch verschiedene Arten von Ceramidasen gebildet (Abb. 5) und scheinen im Gegensatz zu Ceramid, das vorwiegend zum Stop des Zell-Zyklus und zur Apoptose führt, vor allem an den

Prozessen der Zell-Aktivierung, wie der Proliferation und Differenzierung beteiligt zu sein. Die Tatsache, daß Sphingosin und S1P aus Ceramid und indirekt durch Hydrolyse von Sphingomyelin entstehen, macht biologische Untersuchungen, insbesondere solche, die die Gabe von Ceramid-Analoga einschließen jedoch schwer interpretierbar.

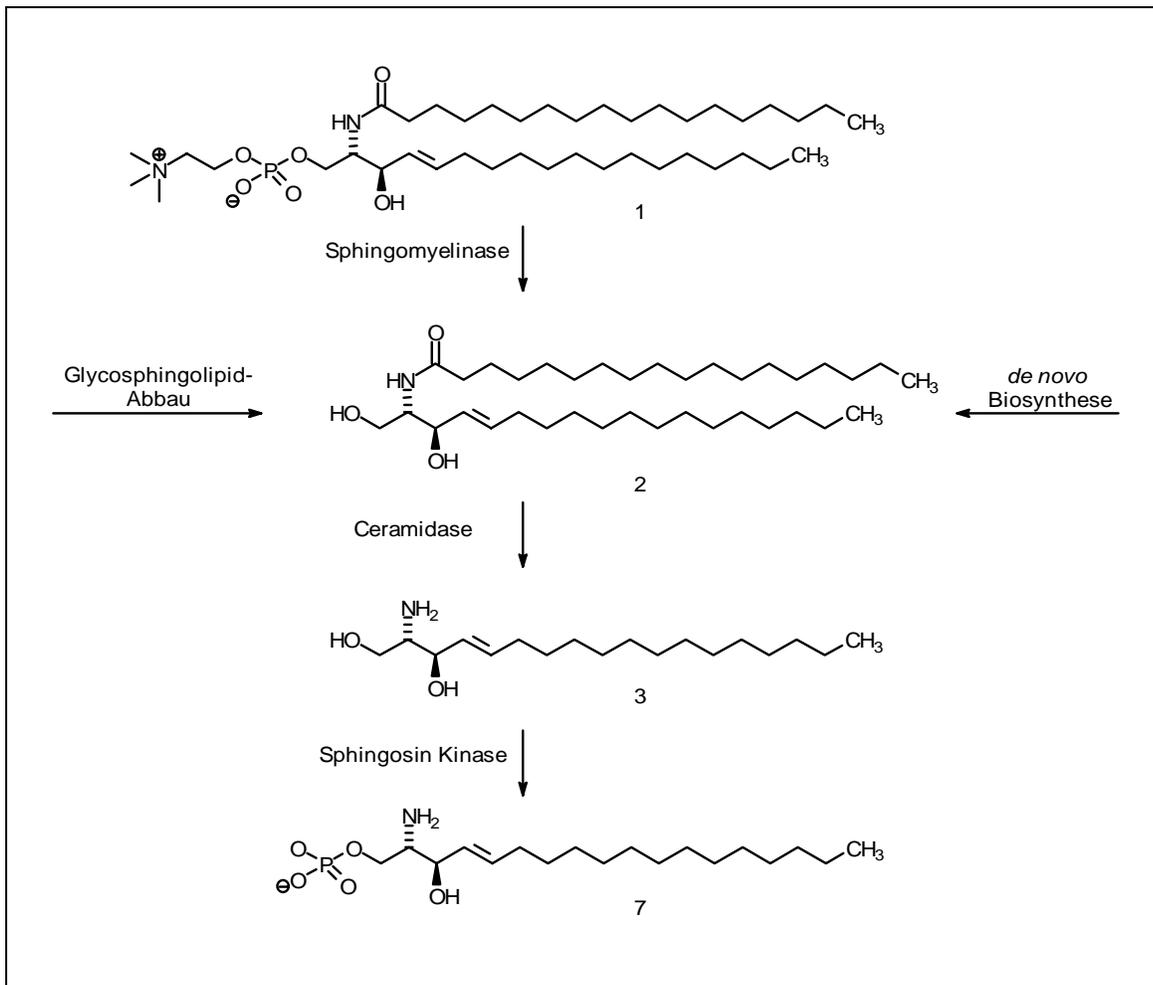


Abb. 5: Sphingomyelin und Abbauprodukte

2.3.1 Der Sphingosin-1-phosphat Rezeptor EDG-1

Kürzlich konnte mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor EDG-1 (*Endothelial Differentiation Gene*) ein spezifischer Rezeptor für S1P ($K_d = 8,1 \text{ nM}$) identifiziert werden.^[34] Untersuchungen zeigten, daß dieser Rezeptor in einem frühen Stadium der Differenzierung von menschlichen Endothelzellen in Kapillaren-artige Tubuli, einem *in vitro* Modell für die Angiogenese, induziert wird.

Sphingosin-1-phosphat wird in den Blutplättchen gespeichert und während der Aktivierung derselben freigesetzt. Die Serumkonzentration von S1P wird auf etwa das 60-fache der Dissoziationskonstante zum Rezeptor EDG-1 geschätzt.^[34] Dies legt nahe, daß das Sphingolipid S1P eine Rolle in der Tumor-induzierten Angiogenese spielen könnte und macht den Rezeptor EDG-1, aber auch die S1P freisetzenden Enzyme wie die Sphingosin Kinase zu interessanten Targets für die Inhibition der Angiogenese.

2.3.2 Ceramid als second messenger

Viele Befunde sprechen dafür, daß die Rolle des Ceramids derjenigen des strukturell ähnlichen, aber funktionell komplementären Diacylglycerins (DAG) entspricht.

Die Beobachtung, daß die Sphingomyelin Hydrolyse durch Vitamin D₃ in HL-60 Zellen induziert wird, führte zur Entdeckung des sogenannten Sphingomyelin Zyklus (Abb. 6).^[2, 35]

Mittlerweile wurde die Induzierbarkeit der Sphingomyelinase Aktivität durch zahlreiche extrazelluläre Agenzien wie die Cytokine Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und γ -Interferon (IFN- γ) bestätigt. Darüber hinaus führen auch Streß-Signale, wie Hitze, Serumentzug, Strahlung und oxidativer Streß zu einer vermehrten Sphingomyelin Hydrolyse.

Nach der Hydrolyse des Sphingomyelins entweder durch eine neutrale (N-SMase), oder aber durch eine saure Sphingomyelinase (A-SMase) kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Ceramid Konzentration. Das gebildete Ceramid kann Ceramid-aktivierte Proteinphosphatasen (CAPPs), Ceramid aktivierte Proteinkinasen (CAPKs), die Proteinkinase Raf, Streß aktivierte Protein Kinasen (SAPKs), die Streß-induzierte p38 Signalkaskade oder auch noch nicht identifizierte zelluläre Mediatoren aktivieren, was letztendlich zu einer Entzündung, dem Anhalten des Zell-Zyklus, oder aber zum Programmierten Zelltod (Apoptose) führen kann (s. Abb. 6).^[4, 5]

Zahlreiche Aspekte der Ceramid-vermittelten Signaltransduktion und insbesondere seine Rolle bei der Apoptose sind jedoch umstritten. ^[6-10] Mit Sicherheit ist die biologische Wirkung des Ceramids nicht uniform und hängt vom Zell-Typ, der Topologie des Ceramids innerhalb der Zelle und von einer Verbindung mit anderen Signalkaskaden (crosstalk) ab. Ein wichtiges Forschungsziel ist daher die Identifizierung und Charakterisierung von Ceramid-

Bindungsproteinen und die Synthese von Ceramid-Analoga, die mit hoher Selektivität und Affinität an diese binden, und zudem eine hohe metabolische Stabilität aufweisen.

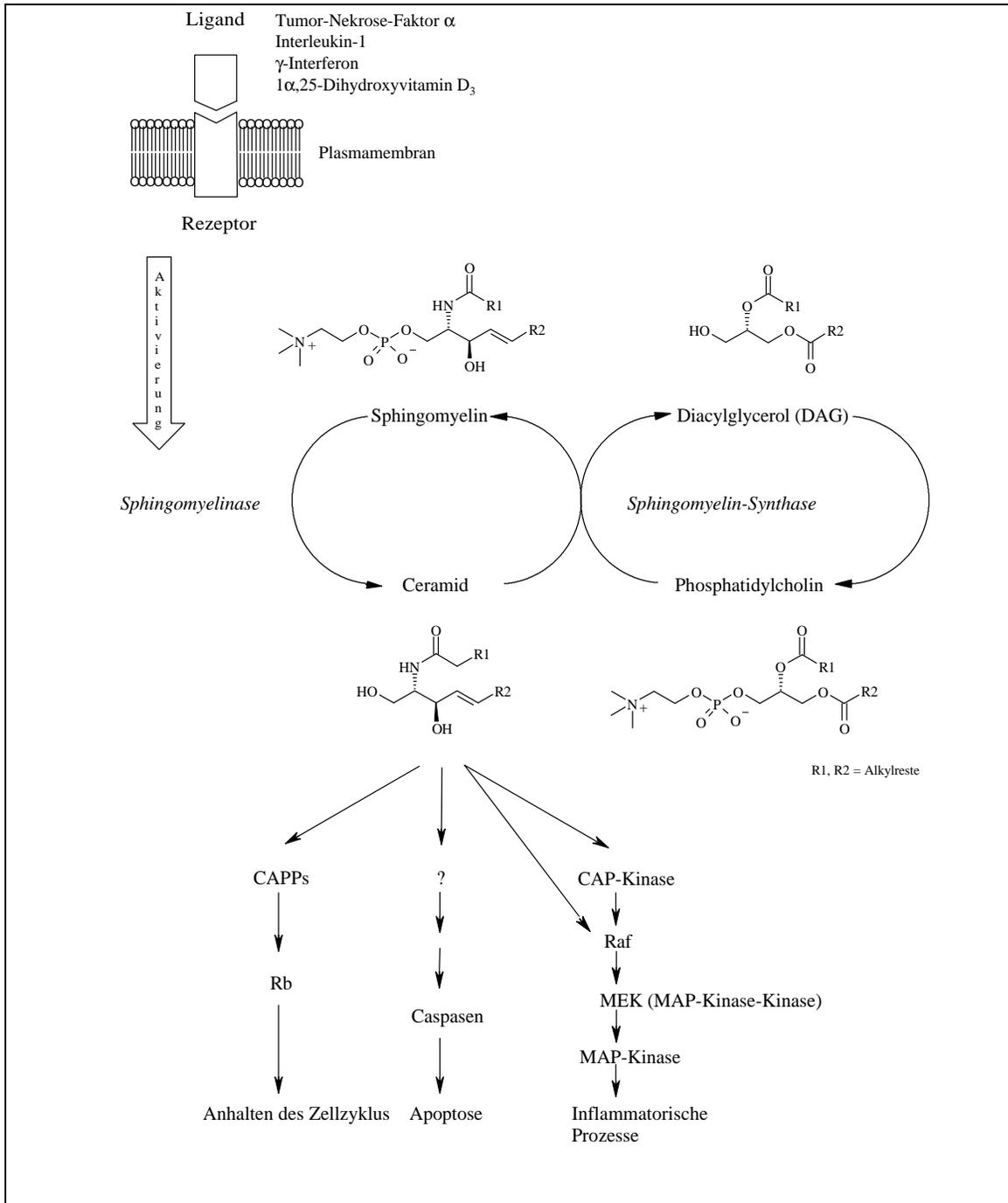


Abb. 6: Ceramid als second messenger. Modifiziert nach Lit. [4] und [1]

CAPPs = Ceramid-aktivierte Protein-Phosphatasen, CAP-Kinase = Ceramid aktivierte Protein-Kinase, Raf = ,
Rb = Genprodukt des Retinoblastoma-Gens, MAP-Kinase = Mitogen aktivierte Proteinkinase

Überaus wichtig für das Verständnis von Ceramid-vermittelter Signaltransduktion ist auch die Klärung der kontrovers diskutierten Frage, welche Sphingomyelinase für die Stimulus-induzierte Ceramid-Produktion jeweils zuständig ist. Selektive Inhibitoren der verschiedenen Sphingomyelinasen können bei der Beantwortung dieser Frage helfen (s. Kapitel 2.4 und 2.5)

2.3.2.1 Ceramid und Krebs

Die im Zusammenhang mit einer Ceramid-Freisetzung diskutierten biologischen Effekte sind grundlegende Mechanismen der Zelle. Insbesondere die Apoptose ist nicht nur für die Entwicklung eines Organismus, sondern auch für dessen Überleben von fundamentaler Bedeutung.^[36] Sie dient zur gezielten Eliminierung „unerwünschter“ oder überflüssiger Zellen. Die Apoptose nimmt eine zentrale Stellung bei der Homöostase von Geweben sowie bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen ein. Die Zahl der Zellen wird innerhalb enger Grenzen gehalten, und nicht benötigte Zellen werden gezielt ausgeschaltet. Bei der Immunabwehr werden z.B. Virus-infizierte Zellen vernichtet. Eine weitere Funktion der Apoptose ist die Vernichtung geschädigter und mutierter Zellen. Diese können mit Hilfe apoptotischer Programme eliminiert werden, bevor sie die Möglichkeit haben, Mutationen zu akkumulieren und möglicherweise zu einer Tumorzelle zu entarten.

Die amerikanischen Wissenschaftler *Kinzler* und *Vogelstein* haben ein Modell entwickelt und experimentell belegt, wie nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs = *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) zu einer Prävention von malignen Erkrankungen im Dickdarm insbesondere bei der *familiären adenomatösen polyposis coli*, einer erblich bedingten Erkrankung, die eine Prädisposition für Dickdarmkrebs darstellt, beitragen.^[37-39]

Ausgangspunkt war die Beobachtung einer signifikant verminderten Rate von Darmkrebs bei Personen die regelmäßig NSAIDs zu sich nehmen. Die Wirkung der NSAIDs beruht auf einer Inhibition der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX 1, COX 2), die für die Synthese verschiedener Prostaglandine, welche als Entzündungs- und Schmerz-Mediatoren fungieren, verantwortlich sind. Durch die Inhibition der Cyclooxygenasen (insbesondere der COX 2, s. Lit.^[40]) und die verringerte Produktion von Prostaglandinen kommt es zu einer Akkumulation von Arachidonsäure, dem Substrat der Cyclooxygenasen. Die akkumulierte Arachidonsäure stimuliert die N-SMase, was zu einer vermehrten Ceramid Produktion und letztendlich zu einer vermehrten Apoptose von entarteten Darmzellen führt.

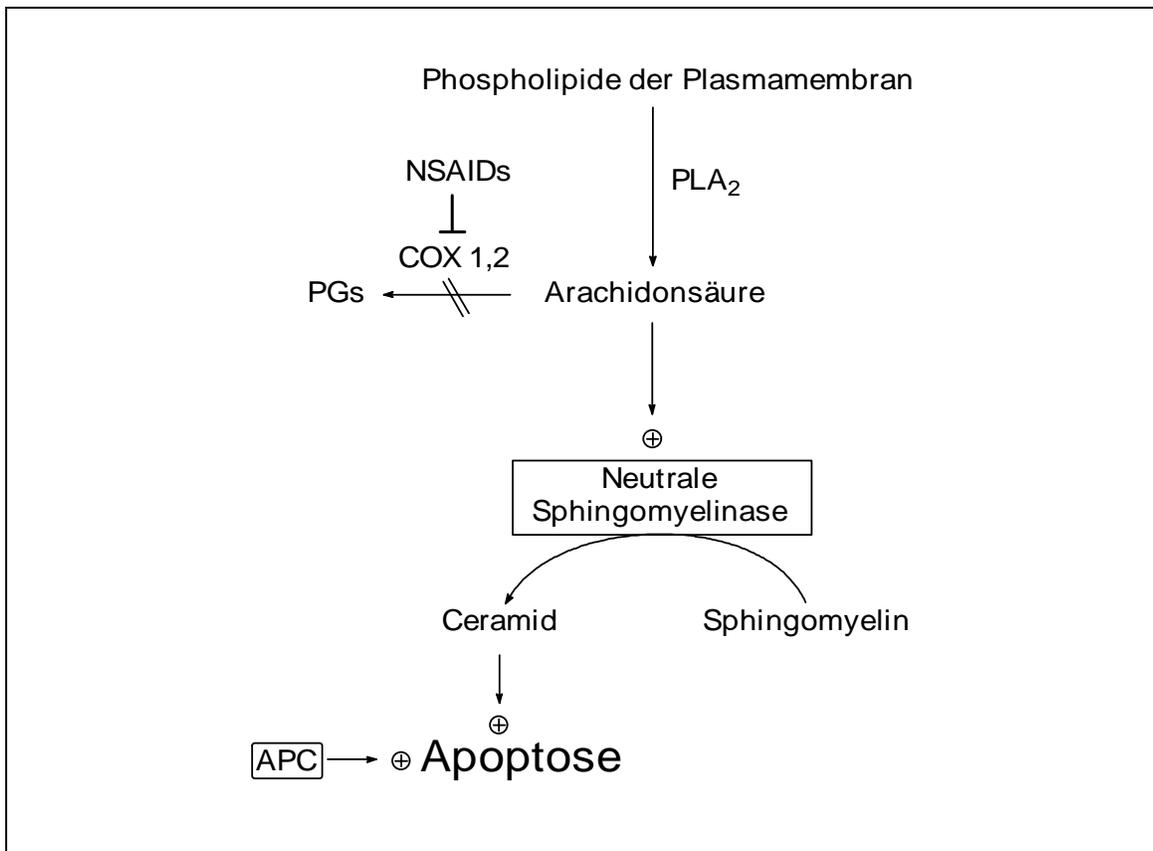


Abb. 7: Von *Kinzler* und *Vogelstein* vorgeschlagener Mechanismus für die Auslösung der Apoptose durch NSAIDs, modifiziert nach Lit.[37] PLA₂ = Phospholipase A₂; NSAIDs = Non-steroidal-antiinflammatory drugs; COX 1, 2 = Cyclooxygenase 1, 2 PGs = Prostaglandine; APC = Adenomatöse Polyposis Coli (hier: Gen, welches bei der APC defekt ist)

Unabhängig von diesen Beobachtungen gibt es zahlreiche weitere Hinweise für eine Involvierung von Ceramid als Mediator bei der Apoptose von entarteten Zellen. So ist z.B. die Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren nicht nur mit einer Krebsprävention, sondern auch mit einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Ceramid Konzentration verbunden.[41]

Des weiteren konnten *Hannun et al.* nachweisen, daß die erhöhte Ceramid Konzentration bei Behandlung von Tumorzellen mit dem Chemotherapeutikum *Etoposid* mit einer Induktion der SPT, dem Schrittmacher-Enzym der Ceramid Synthese, einher geht.[42]

2.4 Die Saure Sphingomyelinase

Die Saure Sphingomyelinase (A-SMase) ist die erste Sphingomyelinase, die entdeckt und isoliert wurde. Bisher gelang die Reinigung bis zur Homogenität aus Urin,[43] weniger reines

Enzym wurde aus Hirn [44] und Plazenta [45] gewonnen. Die cDNA der A-SMase konnte bisher vom Menschen [46, 47] und von der Maus [48] kloniert werden.

Die A-SMase ist ein stark glykosyliertes Enzym und ist einem mehrstufigen Reifungsprozeß unterworfen. Ein Präproenzym (75 kDa) und Proenzym (72 kDa) konnten nachgewiesen werden. Letzteres wird dann größtenteils weiter zu reifer A-SMase (70 kDa) umgewandelt, welche wiederum zu einer kleineren reifen Iso-Form des Enzyms (52 kDa) prozessiert werden kann. Ein kleiner Teil des 72 kDa Proenzym wird jedoch im ER-Golgi Komplex zu einem Protein (57 kDa) unbekannter Funktion abgebaut.

Die Saure Sphingomyelinase erscheint durch ihre Lokalisation vor allem in den Lysosomen der Zelle für eine Rolle in der Signaltransduktion schlecht positioniert. Es gilt jedoch als gesichert, daß die A-SMase nach einer entsprechenden Stimulation schnell translokiert und auch auf der Außenseite der Plasmamembran in GSL-reichen Mikrodomänen vorkommt, während unstimulierte Zellen nahezu keine A-SMase auf der äußeren Plasmamembran aufweisen. Untersuchungen vor allem von der Arbeitsgruppe von *Kröncke* haben gezeigt, daß die A-SMase mit der sogenannten „*death domain*“ des TNF- α Rezeptor assoziiert ist, und daß die A-SMase Aktivierung den p55 TNF-Rezeptor, und die Proteine FADD (Fas associated protein with death domain) und TRADD (TNF-Rezeptor associated protein with death domain) involviert.[49, 50] *Kolesnick et al.* berichten zudem über eine verminderte Apoptose-Fähigkeit von Niemann-Pick Zellen, die einen Defekt der A-SMase aufweisen (s. Kapitel 2.4.1).[51] Die Tatsache, daß die Cytokin-induzierte Sphingomyelin-Hydrolyse in Niemann-Pick Fibroblasten nicht affektiert wird, ist jedoch ein starkes Argument gegen eine exklusive Rolle der A-SMase als Signalmolekül.

2.4.1 Die Niemann-Pick'sche Erkrankung

Die von Niemann und Pick in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts erstmals beschriebene Niemann-Pick Erkrankung ist im Allgemeinen durch einen Defekt in der Sauren Sphingomyelinase und eine Akkumulation von Sphingomyelin gekennzeichnet. Die Krankheit wird in der Hauptsache in einen neuronopathischen Typ A, der im frühen Kindesalter auftritt, einen nicht-neuronopathischen Typ B, der ohne Beteiligung des ZNS einher geht sowie einen Typ C, dessen Ursache jedoch kein A-SMase Defekt ist, unterteilt.[5] Während der Typ A durch vergrößerte innere Organe, eine fortschreitende psychomotorische Retardierung und durch den Tod im zweiten oder dritten Lebensjahr gekennzeichnet ist, kommt es beim Typ B der Krankheit auch zu einer Vergrößerung der inneren Organe, jedoch

ohne Beteiligung des ZNS. Solche Patienten können das Erwachsenenalter erreichen. Die Unterscheidung zwischen Typ A und Typ B Erkrankungen ist jedoch nicht immer einfach. So sind auch gemischte Typen der Niemann-Pick'schen Erkrankung, sowie Typ-B Erkrankungen, die später zu einer Typ A Erkrankung übergegangen sind, beschrieben worden.

Zellen von Niemann-Pick Patienten stellen ein geeignetes System für die Untersuchung der Rolle der A-SMase in der Signaltransduktion dar.

2.4.2 Inhibitoren der Sauren Sphingomyelinase

Da für Studien, welche die Rolle der A-SMase für die Zellregulation zum Gegenstand haben die entsprechenden Maus-Modelle der Niemann-Pick'schen Erkrankung, bzw. A-SMase Knock-out Mäuse zur Verfügung stehen, ist man nicht so sehr auf Inhibitoren dieses Enzyms angewiesen, wie im Fall der N-SMase. Dennoch ist die A-SMase aufgrund der o.g. zahlreichen Hinweise für eine Beteiligung am Prozeß der Apoptose ein interessantes pharmakologisches Target.

Zur Zeit sind jedoch nur wenige sehr moderate Inhibitoren der A-SMase bekannt. Hierzu zählen neben Phosphatidylinosit-4',5'-bisphosphat, Adenosin-3',5'-bisphosphat und Adenin-9- β -D-arabinofuranosid-5'-monophosphat ($IC_{50} = 1-5 \mu M$) der Calciumkanal-Antagonist SR33557 8 (bei $30 \mu M$ 72% Hemmung in einer Leukämiezell-Linie) [52] und L-Carnitin 9.[53, 54]

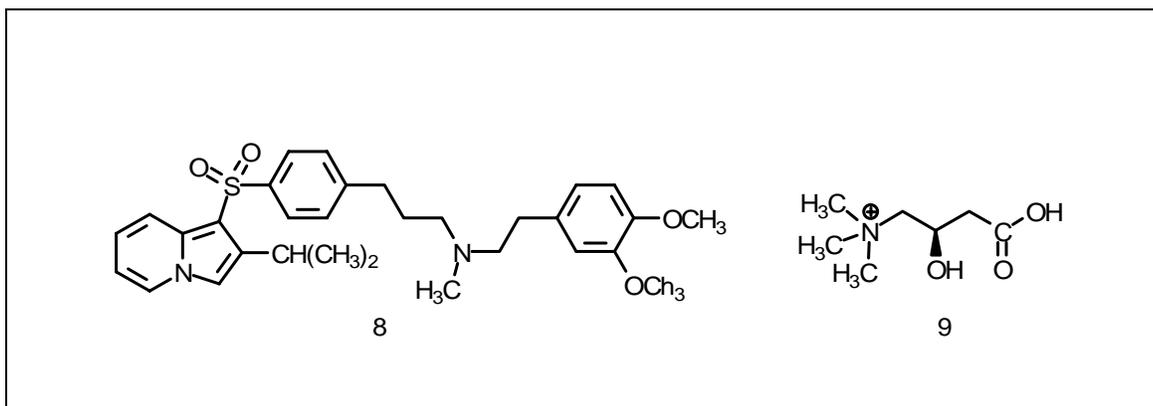


Abb. 8: Der Calciumkanal-Blocker SR33557 8 und L-Carnitin 9.

2.5 Die Neutrale Sphingomyelinase

Bis heute ist eine Reihe verschiedener Sphingomyelinasen mit einem pH Optimum im neutralen Bereich beschrieben worden. Seit längerem ist bekannt, daß die N-SMase in mindestens zwei Isoformen, einer Plasmamembran-gebundenen Magnesium-abhängigen N-SMase und einer cytosolischen, Magnesium-unabhängigen N-SMase, vorkommt. Eine Studie der N-SMase aus Hasen-Skelett-Muskeln beschreibt eine Membran-ständige Magnesium-abhängige Neutrale Sphingomyelinase (N-SMase) mit einem Molekulargewicht von ca. 92 kDa und eine cytosolische, Magnesium-unabhängige Isoform mit einem Gewicht von ca. 53 kDa.^[55] Erst in jüngster Zeit wurde von unabhängigen Arbeitsgruppen über eine weitgehende Reinigung der N-SMase berichtet.

Die Arbeitsgruppe von *Hannun* berichtete 1998 über die partielle Reinigung (4098-fach) der N-SMase aus Rattenhirn.^[56] Dieses Enzym ist Magnesium-abhängig, wird durch GSH und Cu^{2+} inhibiert und hat eine apparente Molekülmasse von etwa 60 kDa. *Kröncke, Sandhoff* und Mitarbeiter beschreiben die Reinigung der Magnesium-abhängigen N-SMase aus Rinderhirn bis zur apparenten Homogenität.^[57] Dieses Enzym hat ein Molekulargewicht von 97 kDa, wird stimuliert durch Phosphatidylserin und inhibiert durch Glutathion und Scyphostatin (s.u.). Kürzlich wurde von *Chatterjee et al.* über die Klonierung einer weiteren N-SMase berichtet.^[58]

Die Arbeitsgruppe von *Stoffel* berichtete ebenfalls mehrfach über die Klonierung einer Magnesium-abhängigen N-SMase, die durch Sequenzvergleiche mit anderen Magnesium-abhängigen Enzymen identifiziert wurde.^[59, 60] Die N-SMase Aktivität wurde zwar von verschiedenen Gruppen bestätigt, jedoch zeigte es sich, daß die bevorzugte enzymatische Reaktion die einer Lyso-PAF-Phospholipase C (PAF = *platelet activating factor*) ist.^[61, 62] Diese Eigenschaft konnte bisher jedoch bei keiner anderen N-SMase nachgewiesen werden. Zudem besteht keine Sequenz-Homologie mit dem von *Chatterjee* beschriebenen Enzym.

Die Plasmamembran-ständige Magnesium-abhängige N-SMase scheint schon aufgrund ihrer Lokalisation gut als Signalmolekül geeignet zu sein. Die Induzierbarkeit durch extrazelluläre Agenzien sowie die Regulierbarkeit durch Arachidonsäure und Glutathion in physiologischen Konzentrationen unterstreichen dies.

Kürzlich wurde von *Krönke et al.* ein Protein identifiziert, welches den p55-TNF-Rezeptor funktionell mit der N-SMase verbindet.^[63] Dieses Protein FAN (*factor associated with N-*

SMase activation) kann außerdem durch CD40 stimuliert werden, was eine Aktivierung der N-SMase und den Programmierten Zelltod zur Folge hat.^[64]

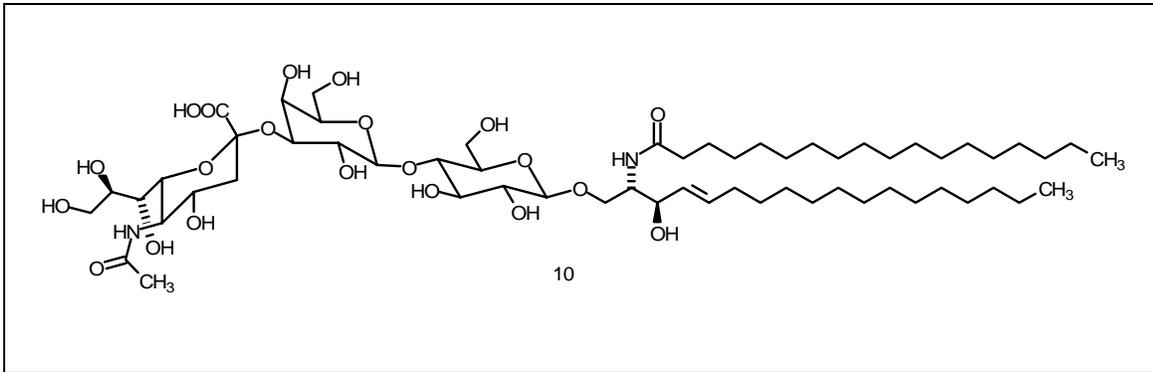
Man vermutet, daß das aktive Zentrum der N-SMase auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran gelegen ist.^[5] Sphingomyelin jedoch ist fast ausschließlich zur extrazellulären Seite der Plasmamembran orientiert. Dies würde bedeuten, daß der N-SMase in einer intakten Zelle kaum Substrat zur Verfügung stehen würde. Ein Hinweis darauf könnte die Tatsache sein, daß Anästhetika wie Halothan, die eine Erhöhung der Membranfluidität bewirken, in klinischen Konzentrationen zu einer drastischen Erhöhung der Sphingomyelin Hydrolyse durch die N-SMase führen.^[65]

Die Beobachtung, daß die N-SMase Inhibitoren Scyphostatin und Macquarimicin A (s. Kap. 2.5.1) sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* bemerkenswerte anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen, und die Tatsache, daß bisher keine Erbkrankheit bekannt ist, die auf einer N-SMase Defizienz beruht, sowie die außerordentlich große Zahl an Publikationen, die über eine Rolle der N-SMase in der Signaltransduktion berichten, sprechen für eine entscheidende Rolle der N-SMase bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse. Die Rolle und die Funktionsweise der N-SMase bedürfen jedoch einer weiteren Aufklärung.

2.5.1 Inhibitoren der Neutralen Sphingomyelinase

2.5.1.1 Frühe Arbeiten

Mit dem Gangliosid G_{M3} konnte durch *Lister et al.* einer der ersten Inhibitoren der Neutralen Sphingomyelinase identifiziert werden.^[66] Die Ganglioside G_{M1} , G_{M2} , G_{M3} sowie G_{D1a} , G_{D1b} und G_{T1b} zeigen alle eine Inhibition der N-SMase, jedoch ist die Inhibition durch G_{M3} ($IC_{50} = 45 \mu M$, gemischt-kompetitiv) am stärksten. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß Cu^{2+} die N-SMase mit einem IC_{50} -Wert von $5 \mu M$ inhibiert, ein Effekt, der jedoch nicht auf einer Konkurrenz um die Bindungsstelle des Mg^{2+} beruht. Phosphatidylserin zeigte bei einer Konzentration von $250 \mu M$ eine 50 prozentige Aktivierung der N-SMase.

Abb. 9: Das Gangliosid G_{M3} 10

Ebenfalls von *Lister et al.* wurde gezeigt, daß 3-O-Methyl-sphingomyelin ($IC_{50} = 50 \mu M$) und 3-O-Ethyl-sphingomyelin ($IC_{50} = 140 \mu M$) die N-SMase, jedoch nicht die A-SMase inhibieren.^[67] Interessanterweise wird 3-O-Methyl-sphingomyelin durch die N-SMase nicht hydrolysiert, 3-O-Desoxysphingomyelin hingegen stellt weder einen Inhibitor noch ein Substrat für die N-SMase dar.

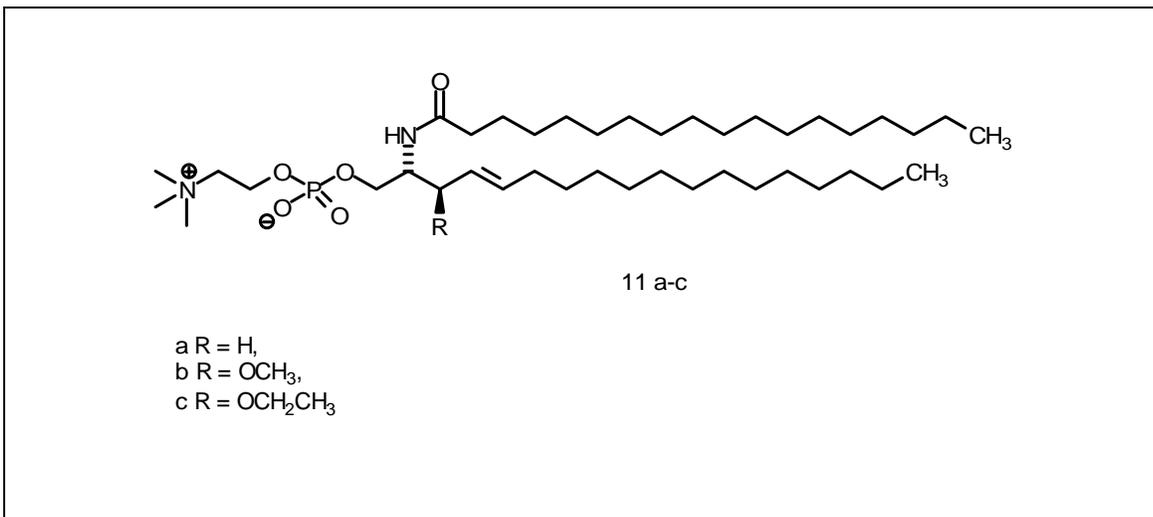


Abb. 10: 3'-modifizierte Sphingomyelin-Analoga 11 a-c

2.5.1.2 Inhibition der N-SMase durch Glutathion

Die N-SMase wird durch Glutathion (GSH) in physiologisch relevanten Konzentrationen inhibiert. *Liu* und *Hannun* entdeckten, daß Glutathion in Konzentrationen von 4 mM und höher eine Inaktivierung der N-SMase zur Folge hat.^[12, 13] Dieser Effekt verstärkt sich deutlich bei Vorinkubation mit GSH, jedoch konnte durch anschließende Auswaschung des GSH und die vollständige Wiederherstellung der Enzymaktivität gezeigt werden, daß es sich

bei dem beschriebenen Effekt nicht um eine irreversible Inhibition durch GSH handelt. Ebenfalls freie Thiol-Gruppen enthaltende Substanzen wie Dithiothreitol (DTT) und β -Mercaptoethanol wirken sich in Konzentrationen bis 20 mM nicht auf die N-SMase Aktivität aus.

Eine Studie mit GSH verwandten Substanzen ergab, daß sowohl S-Methyl-GSH als auch S-Ethyl-GSH ebenso potente Inhibitoren der N-SMase sind, und daß oxidiertes Glutathion (GSSG) die N-SMase im Vergleich zur reduzierten Form mehr als doppelt so stark inhibiert.

Das GSH Fragment γ -Glutamylcystein zeigt ebenfalls eine im Vergleich zu GSH etwas potentere Inhibition der N-SMase.

2.5.1.3 Scyphostatin

Mit dem Naturstoff Scyphostatin, einem Metaboliten aus *Trichopeziza mollissima*, gelang es 1997 Forschern der *Sankyo* Gruppe erstmals einen potenten Inhibitor der N-SMase ($IC_{50} = 1 \mu M$, A-SMase $IC_{50} = 49,3 \mu M$) zu identifizieren.^[15] Die vollständige Aufklärung der Stereochemie, sowie die Synthese der lipophilen Seitenkette erfolgte ebenfalls durch Mitarbeiter der *Sankyo* Gruppe.^[68, 69]

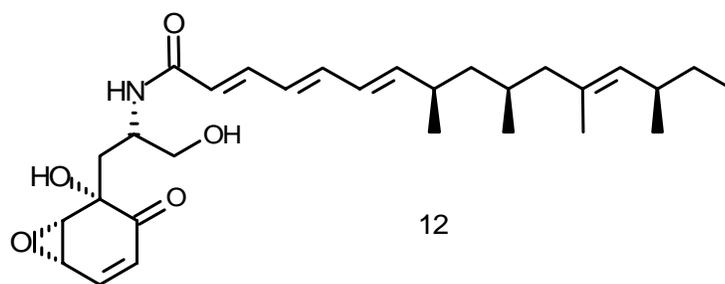


Abb. 11: Scyphostatin 12

Scyphostatin zeigt eine Konzentrations-abhängige Inhibition der N-SMase, die durch Sphingomyelin kompetierbar ist, jedoch konnte bisher die Art der Inhibition nicht eindeutig festgelegt werden.^[16] Die Arbeitsgruppen von *Kröncke* und *Sandhoff* konnten des weiteren zeigen, daß Scyphostatin auch die gereinigte N-SMase aus Rinderhirn inhibiert (95% Inhibition bei 20 μM).^[70]

Erste biologische Untersuchungen mit Scyphostatin ergaben, daß Scyphostatin bemerkenswerte anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist (s. Macquarimicin A).^[71]

Untersuchungen von *Futerman et al.* zeigen darüber hinaus, daß in kultivierten Neuronen die Effekte des Nerven Wachstumsfaktors (NGF) und die damit verbundene Ceramid Freisetzung durch Scyphostatin unterbunden werden.^[72]

2.5.1.4 Alutenusin und Macquarimicin A

Der seit längerem bekannte Pilzmetabolit Alutenusin 13 wurde 1999 von *Uchida et al.* als spezifischer N-SMase Inhibitor identifiziert (nicht-kompetitiv, $K_i = 20 \mu\text{M}$, $K_m = 35 \mu\text{M}$).^[73]

Die A-SMase-Aktivität wird bei einer Konzentration von $950 \mu\text{M}$ nicht beeinflusst, eine bereits beschriebene Inhibition der MLCK (*myosin light chain kinase*) wird erst bei höheren Konzentrationen ($\text{IC}_{50} = 340 \mu\text{M}$) beobachtet.

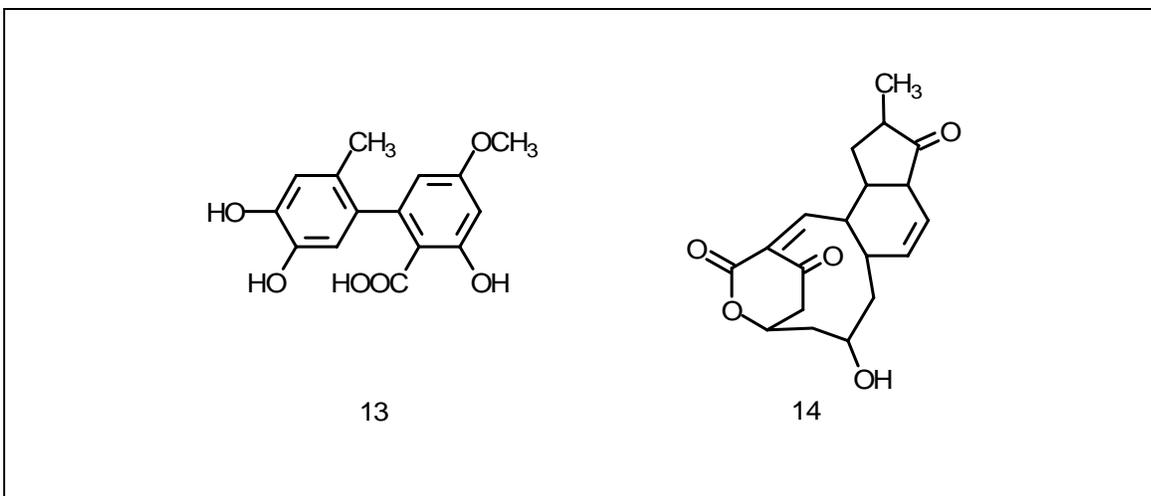


Abb. 12: Die N-SMase Inhibitoren Alutenusin 13 und Macquarimicin A 14

Macquarimicin A 14 inhibiert die N-SMase mit einem $K_i = 70 \mu\text{M}$ mit einem nicht-kompetitiven Inhibitionsmuster und die A-SMase mit etwa vierfach niedrigerer Potenz.^[74]

Trotz der vergleichsweise schwachen Affinität von Macquarimicin A zur N-SMase werden bakterielle N-SMasen, sowie PC-PLC und PA-PHLP nicht inhibiert. Macquarimicin A weist ähnlich wie Scyphostatin anti-inflammatorische Eigenschaften, sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* auf. Die Lipopolysaccharid (LPS) induzierte IL-1 β Produktion in menschlichen Monozyten sowie induzierte Ödeme an Rattenpfoten wurden durch Macquarimicin A in nicht-toxischen Dosen signifikant inhibiert. Interessanterweise scheint Macquarimicin A, genauso wie Scyphostatin oral wirksam zu sein.

2.5.1.5 Die Hydrochinone F-11334s

Die Hydrochinone F-11334 A₁₋₃ 15-17 und B_{1,2} 18, 19 stellen eine neue Klasse von SMase Inhibitoren aus *Acremonium murorum* dar.^[75, 76] Die Stereochemie dieser Substanzen ist bisher noch nicht aufgeklärt. Die IC₅₀ Werte für die N-SMase Inhibition betragen 35,3 µM (A₁ 15), >1 mM (A₂ 16 und A₃ 17), 18,5 µM (B₁ 18) und 7,4 µM (B₂ 19), es wurden bisher jedoch keine Daten bezüglich einer eventuellen A-SMase Inhibition publiziert.

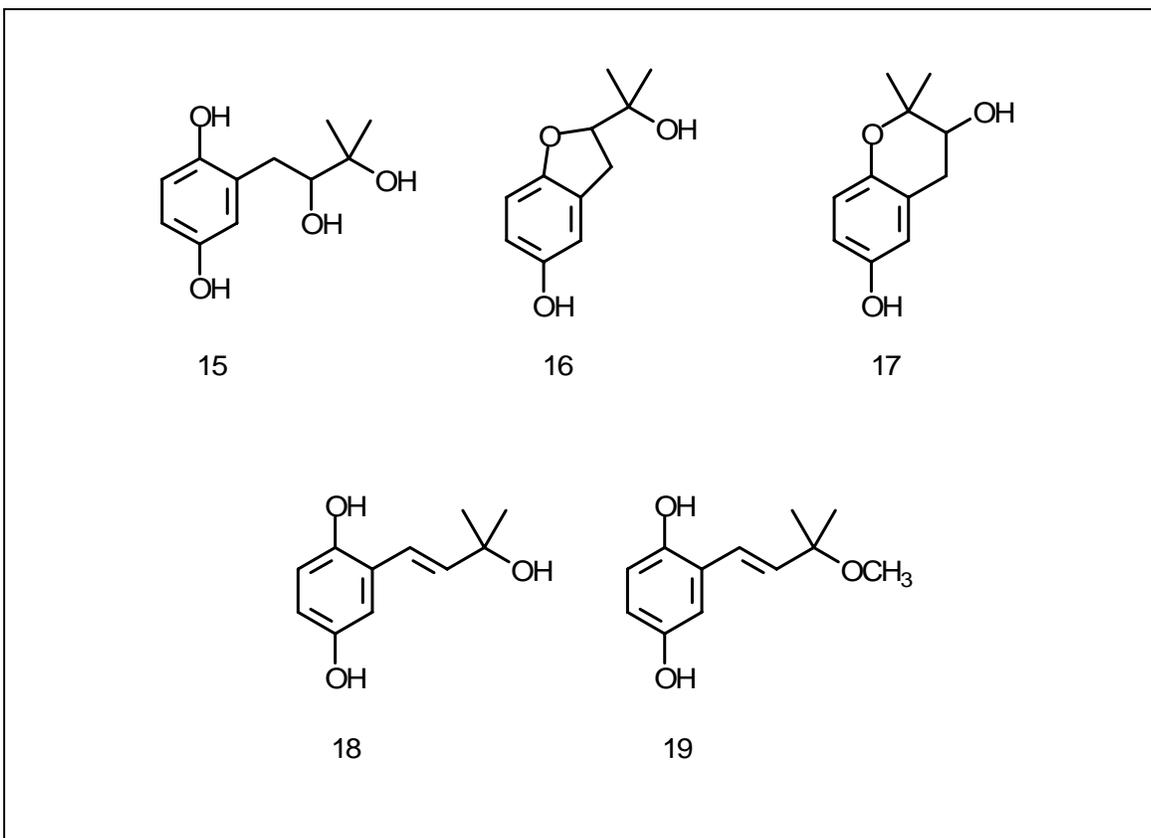


Abb. 13: Die Hydrochinone F-11334s 15-19

2.6 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, potentielle Inhibitoren der Neutralen Sphingomyelinase herzustellen und zu testen. Als Voraussetzung sollte ein N-SMase und A-SMase Testsystem mit partiell gereinigten Rattenhirn-Mikrosomen als Enzymquelle und radioaktiv markiertem Sphingomyelin als Substrat etabliert werden.

Ausgehend von Scyphostatin 12 als Leitstruktur sollte ein erster potentieller N-SMase Inhibitor synthetisiert, und charakterisiert werden. Vorausgegangene Experimente von *Giannis et al.* hatten gezeigt, daß kurzkettinge Ceramid-Analoga, wie z.B. 2-*N*-Lauroylamido-1,3-propanediol eine schwache Inhibition der N-SMase bewirken. Des weiteren wurde vermutet, daß die N-SMase in Analogie zu anderen Phosphodiesterasen nukleophile Gruppen (wie z.B. die Seitenketten von Arginin, Serin oder Cystein) im aktiven Zentrum aufweisen würde, die mit geeigneten Elektrophilen in der Kopfgruppe der zu synthetisierenden Ceramid-Analoga reagieren würden.

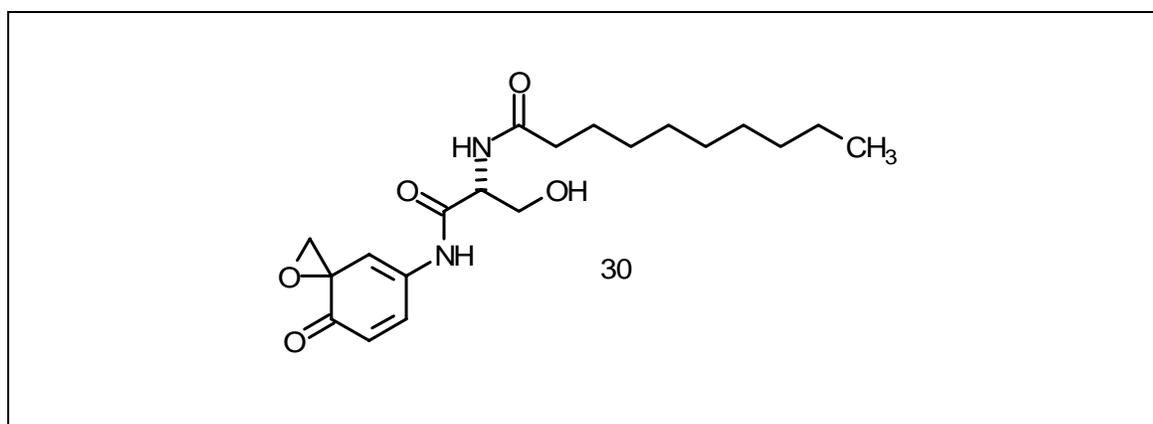


Abb. 14: Zielverbindung: das Spiroepoxid 30

Die Verbindung 30 mit einer im Vergleich zu Scyphostatin reaktiveren Epoxidfunktion [77-81] sollte diese Voraussetzungen erfüllen. Für den Fall, daß einer oder mehrere Inhibitoren der N-SMase gefunden würden, sollte eine Optimierung dieses Inhibitors mit Methoden der Synthese von Peptidmimetika als auch der kombinatorischen Chemie erfolgen.

Darüber hinaus sollten einige im Arbeitskreis vorliegende Substanzen auf eine eventuelle N-SMase oder A-SMase Inhibition überprüft werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Etablierung des N-SMase und A-SMase Testsystems

Die partielle Reinigung der N-SMase und der A-SMase erfolgte analog zu einer von *Hannun et al.*[12, 56] publizierten Methode, durch Präparation von Mikrosomen aus Rattenhirn. Dazu

wurden vier männliche CD-Ratten decapitiert, die Gehirne vollständig entfernt und in einem mit Protease-Inhibitoren angereicherten Puffer homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend durch zwei Zentrifugations-Schritte und einen Chromatographie-Schritt (Anionenaustauscher) aufgereinigt, so daß die gewonnene Enzym-Präparation mehr als sechs Monate ohne Einbußen benutzbar blieb.

Die so gewonnene Mikrosomen-Präparation enthielt sowohl N-SMase als auch A-SMase. Der entsprechende Assay erfolgte jeweils in Gegenwart von Detergenz in einem Acetat-Puffer mit pH 4,5 (A-SMase) oder in einem Tris-HCl-Puffer mit pH 7,4 (N-SMase), der zusätzlich Mg^{2+} enthielt. Für den Nachweis der SMase-Aktivität wurde ^{14}C -markiertes Sphingomyelin eingesetzt.

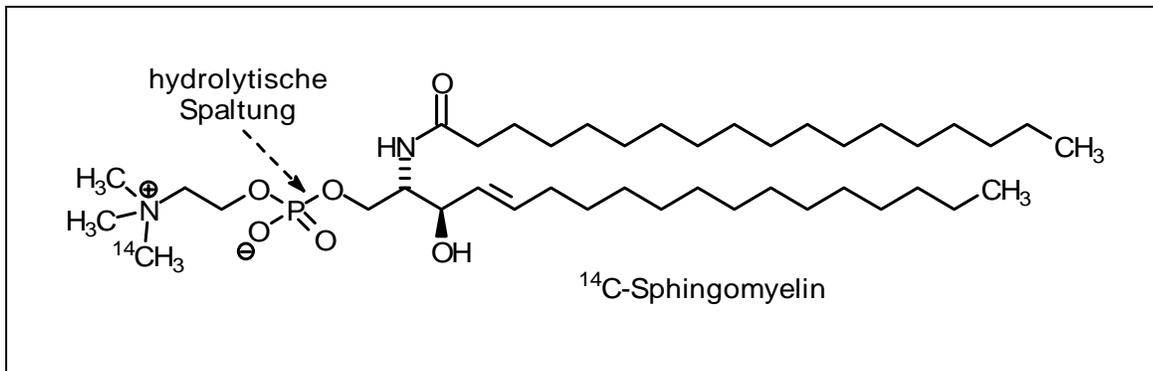


Abb. 15: ^{14}C -Sphingomyelin

Der Assay basiert darauf, daß das radioaktive Substrat bei der Hydrolyse durch die SMase in hydrophiles, radioaktiv markiertes Phosphorylcholin und hydrophobes Ceramid gespalten wird. Die enzymatische Reaktion wird zu einer definierten Zeit durch Zugabe einer Mischung aus Chloroform und Methanol gestoppt, und nach Ausschütteln und Phasentrennung wird die Aktivität der polaren Oberphase aus Wasser und Methanol, die das radioaktive Phosphorylcholin enthält, mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt. Der cpm-Wert (*counts per minute*) des Szintillationszählers ist direkt proportional zur Menge des vom Enzym umgesetzten Substrates.

3.1.1 Identifizierung von irreversiblen SMase-Inhibitoren

Die irreversible Inhibition eines Enzyms ist dadurch gekennzeichnet, daß nachdem einmal der Inhibitor zu dem Enzym zugegeben worden ist, die ursprüngliche Enzymaktivität nicht mehr wiederherstellbar ist. Im einfachsten Fall wird ein Enzym irreversibel inhibiert, indem der

Inhibitor am aktiven Zentrum, oder aber an anderer Stelle an das Enzym kovalent bindet, und es dadurch inaktiviert. Um das Enzym zu reaktivieren, müßte eine kovalente Bindung selektiv gespalten werden. Im Gegensatz dazu wird ein z.B. kompetitiver Inhibitor von dem Enzym reversibel gebunden, und kann durch einen besseren Inhibitor, oder aber durch große Mengen an Substrat aus der Bindungstasche verdrängt werden. Die Inhibition des Enzyms hängt von der Konzentration des Inhibitors und der des Substrats ab.

Im Beispiel der kovalenten Inhibition eines Enzyms braucht man hingegen gerade ein einziges Äquivalent des Inhibitors, bezogen auf die Stoffmenge des Enzyms, um dieses vollständig zu inhibieren. Da die Konzentration des Enzyms im Assay in der Regel sehr gering ist, und der Inhibitor durch das Substrat nicht verdrängt werden kann, ist die kovalente und allgemein die irreversible Inhibition eines Enzyms kaum abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. des Substrates, sondern in erster Linie abhängig von der Zeit, die der Inhibitor benötigt, das Enzym irreversibel zu blockieren. Für einen kompetitiven Inhibitor hingegen ist keine Zeitabhängigkeit zu erwarten, da sich in diesem Fall sehr schnell ein dynamisches Gleichgewicht einstellt, und die Aktivität des Enzyms zeitlich konstant bleibt, solange die Konzentration des Substrates annähernd konstant bleibt.

Für die Identifizierung von irreversiblen Inhibitoren wurden daher die betreffenden Inhibitoren zusammen mit dem Enzym bei 37 °C, in Abwesenheit von Substrat, in der Regel 15, 39, 45, 60 und 90 Minuten vorinkubiert, anschließend wurde Substrat zugegeben und die enzymatische Reaktion dadurch gestartet.

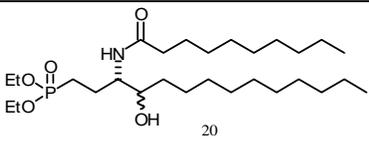
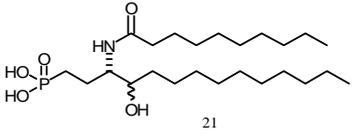
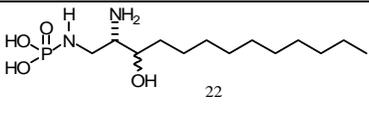
Im Falle eines reversiblen Inhibitionsmechanismus würde man erwarten, daß sich jedesmal am Enzym das gleiche Verhältnis von Inhibitor zu Substrat ausbildet, und daß jedesmal die gleiche Aktivität bzw. Inhibition zu beobachten ist. Im Falle eines irreversiblen Mechanismus würde man erwarten, daß mit zunehmender Dauer der Vorinkubation die Inhibition des Enzyms zunimmt.

Da die Aktivität des Enzyms über die Dauer der Vorinkubation jedesmal –erwartungsgemäß– auch ohne Inhibitor langsam abnahm, wurde zu jeder Vorinkubation mit Inhibitor auch parallel eine Vorinkubation ohne Inhibitor durchgeführt, um so die natürliche Inaktivierung des Enzyms z.B. durch enzymatischen Verdau oder Denaturierung zu ermitteln und so einen Nullwert für die Inhibition des Enzyms für jeden Zeitpunkt zu erhalten. Die natürliche Inaktivierung erfolgte bei frischer Enzym-Präparation nur sehr langsam (ca. 10% Aktivitätsverlust bei 90 Minuten Vorinkubation), bei Präparationen, die älter als sechs Monate waren, nahm der Aktivitätsverlust bei der Vorinkubation stark zu, so daß die Messungen

teilweise unbrauchbar wurden. Als Toleranzgrenze wurde daher ein Aktivitätsverlust von etwa 15% bei 90 Minuten Vorinkubation festgelegt.

3.1.2 Test von Ceramid-C- und -N-Analoga als potentielle SMase Inhibitoren

Die ersten Verbindungen, die auf eine N-SMase oder A-SMase Inhibition getestet wurden, waren die im Arbeitskreis vorhandenen Sphingomyelin-Analoga 20-22.^[82, 83] Bei diesen Verbindungen wurde die von der SMase hydrolysierbare Phosphorsäureester-Bindung gegen eine nicht hydrolysierbare Bindung ausgetauscht. Bei einer Konzentration von 200 μM wurde jedoch weder die N-SMase, noch die A-SMase inhibiert (s. Tab.1).

Getestete Verbindung	Inhibition / Konzentration	Herkunft
 <p>20</p>	Keine Inhibition der A-SMase oder der N-SMase bei 200 μM	Dissertation Andreas Schick
 <p>21</p>	Keine Inhibition der A-SMase oder der N-SMase bei 200 μM	Dissertation Andreas Schick
 <p>22</p>	Keine Inhibition der A-SMase oder der N-SMase bei 200 μM	Dissertation Andreas Schick

Tab. 1: Getestete Verbindungen 20-22

3.2 Synthese und enzymatischer Test des Spiroepoxids 30

3.2.1 Synthese der Verbindung 30

Umsetzung von D-Serin 24 mit Decanoylchlorid 23 unter Schotten-Baumann Bedingungen ergab *N*-Decanoyl-D-Serin 25 (Abb. 16). Die anschließende Kopplung des in einer zweistufigen Reaktionssequenz aus dem Aldehyd 26 hergestellten 5-Amino-2-hydroxybenzylalkohols 28 mit 25 unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) / 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) ergab das Derivat 29, welches nach Umsetzung mit Natriumperodat das Spiroepoxid 30 als ein 53:47 Diastereomerengemisch ergab.^[84]

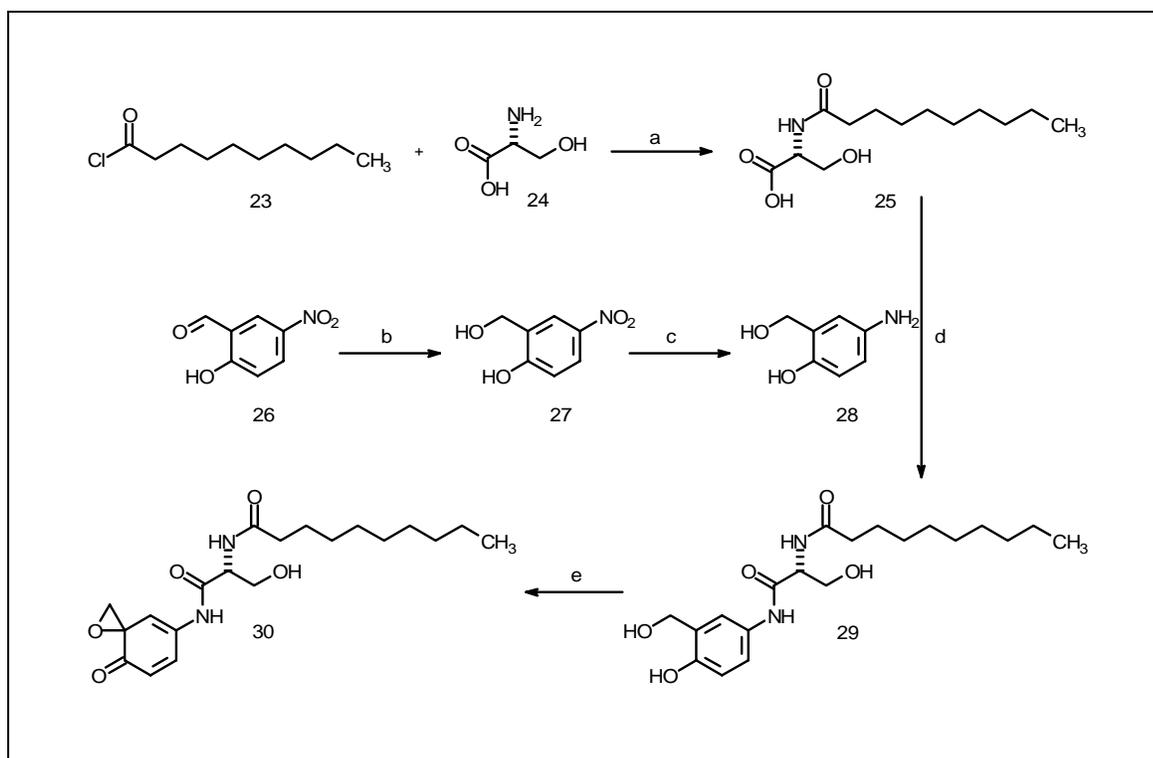


Abb. 16: Synthese des Spiroepoxids 30 – Reagenzien und Reaktionsbedingungen:

a H₂O, THF, 3 Äq. Na₂CO₃, 3 h, 68%; b NaBH₄, EtOH, 1 d, 99%; c In, NH₄Cl, EtOH, 90°C, 3 h, 91%; d DCC, HOBT, DMF, 16 h, 61%; e NaIO₄, MeOH / H₂O, 3 h, 20 °C, 70%.

Interessanterweise konnte das Spiroepoxid 30 bisher nur als 1:1 Komplex mit Methanol oder Ethanol gewonnen werden.

Im ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung zeigte sich ein Singulett mit einem Integral, das 3 Wasserstoffatomen entsprach. Durch ein ¹³C-DEPT und ein CH-COSY Experiment konnte gezeigt werden, daß diese Protonen zu einer Methyl-Gruppe gehören. Durch Zugabe von wenig Methanol zu der Probe entstand ein weiteres Signal im NMR, direkt neben dem des vermeintlichen Methanols. Ein nach Rühren mit der Verbindung in Ethanol und anschließender Trocknung aufgenommenes ¹H-NMR zeigte nun ein Quartett und ein Triplett, mit Integralen, die jeweils 2 und 3 Protonen entsprachen, während das ursprüngliche Singulett verschwunden war. Nach Zugabe von wenig Ethanol zu der Probe entstanden wiederum neue Ethanol-Signale. Mehrere hochaufgelöste Massenspektren zeigten jeweils den Molekülion-Peak des Spiroepoxids 30, und keine Peaks von höherer Masse. Zusammengefaßt sprechen diese Indizien für eine Komplexierung von Methanol und Ethanol durch das Spiroepoxid 30.

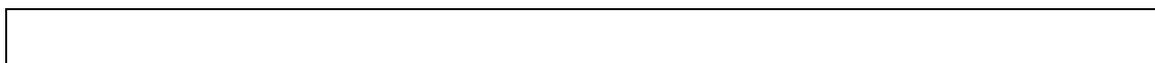
Die Verbindung 30 ist wie andere, über eine Adler-Reaktion hergestellte Verbindungen lichtempfindlich. In festem oder gelösten Zustand (Chloroform) bei -20 °C, im Dunkeln, ist

jedoch nach einem Zeitraum von acht Monaten weder im $^1\text{H-NMR}$, noch im DC eine auch nur teilweise Zersetzung der Verbindung feststellbar.

3.2.2 Die Selektive Inhibition der N-SMase durch das Spiroepoxid 30

Die Verbindung 30 erwies sich im nachfolgenden Enzym-Assay als ein kovalenter Inhibitor der N-SMase (Abb. 17). Das Epoxid 30 wurde in einer Konzentration von 200 μM zusammen mit dem Enzym bei 37 °C 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde Substrat-Lösung hinzu gegeben, so daß die Konzentration des Inhibitors, wie die des Substrates 100 μM betrug. Die enzymatische Reaktion wurde nach 30 Minuten durch Zusatz des Chloroform/Methanol Gemisches gestoppt.

Im A-SMase Assay zeigte das Epoxid 30 selbst bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ keinerlei Inhibition der A-SMase (Abb. 18).



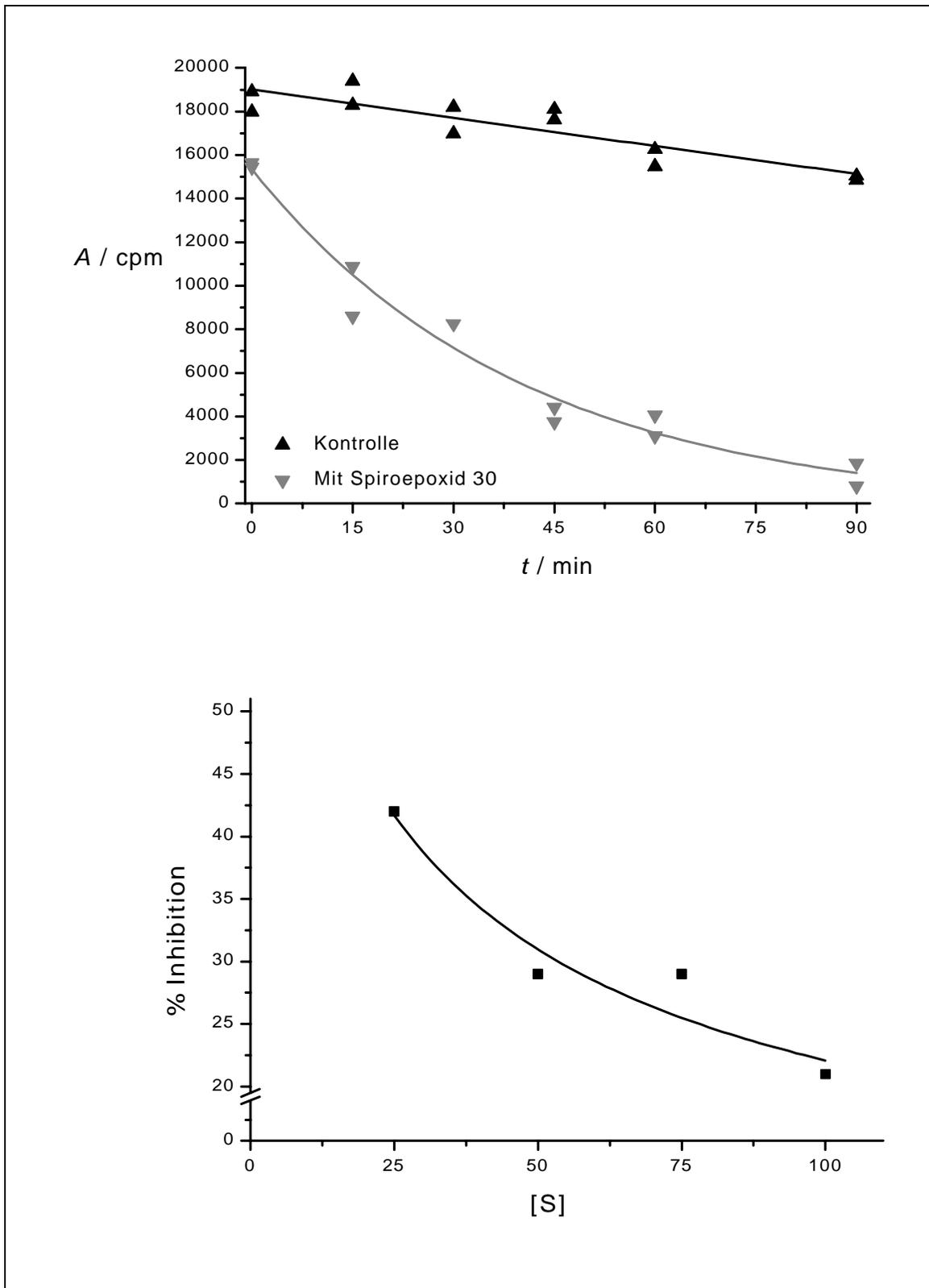


Abb. 17: Oben: Zeitabhängige Inhibition der N-SMase durch das Spiroepoxid 30 [100 μM] A = Aktivität [cpm] t = Vorinkubationszeit Unten: Substratabhängigkeit der Inhibition durch das Spiroepoxid 30 (t = 0).

In einem weiteren Versuch wurde die N-SMase Aktivität in Gegenwart des Inhibitors 30 (100 μM) und des Substrates in verschiedenen Konzentrationen (25, 50, 75 und 100 μM) ohne Vorinkubation untersucht. Es zeigte sich, daß steigende Sphingomyelin-Konzentrationen den inhibitorischen Effekt des Epoxids 30 abschwächten (Abb. 17). Dies läßt vermuten, daß der Inhibitor an das aktive Zentrum der N-SMase bindet.

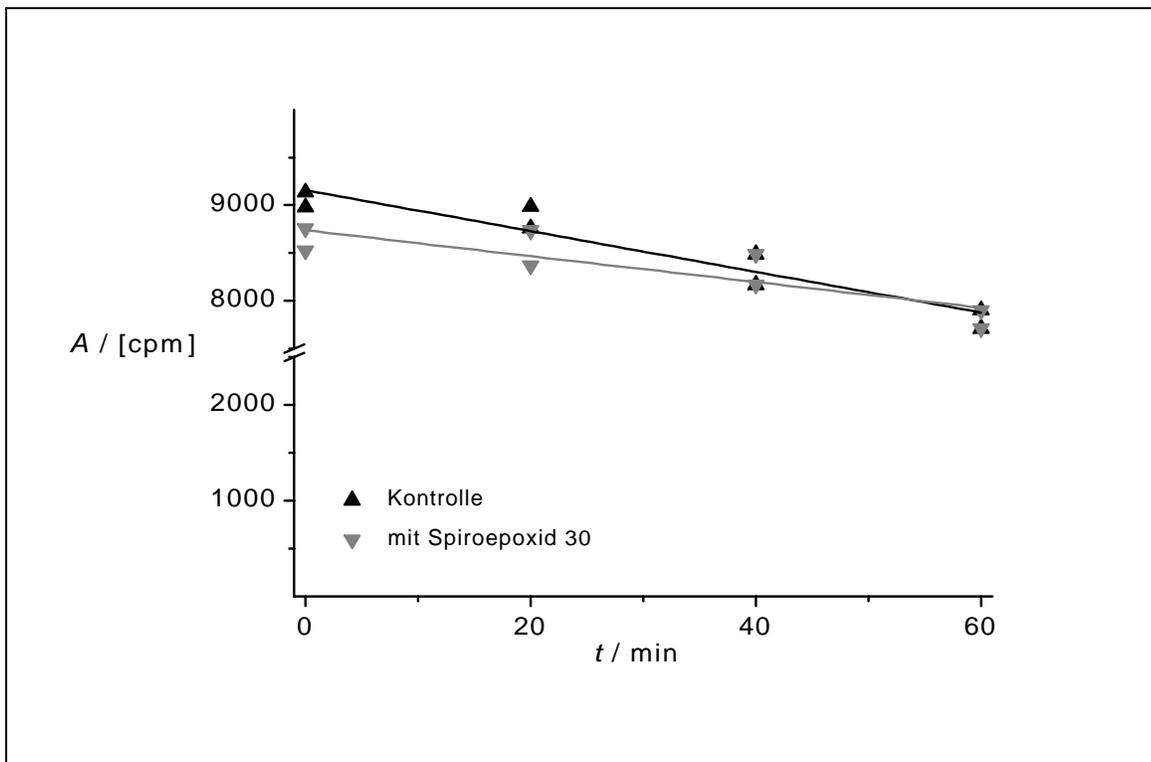


Abb. 18: A-SMase Aktivität in Gegenwart des Spiroepoxids 30 (Konzentration Vorinkubation = 200 μM , Assay-Konzentration = 100 μM) A = Aktivität [cpm] t = Vorinkubationszeit.

Anschließend wurde, um den Einfluß der Konfiguration der Aminosäure zu untersuchen, ausgehend von L-Serin das entsprechende enantiomere Derivat *ent*-30 hergestellt. Dieses zeigte eine Zeit-abhängige Inaktivierung der N-SMase, ähnlich der Inhibition durch die Verbindung mit D-Konfiguration. Die enzymatische Aktivität der A-SMase wurde ebenfalls nicht beeinflußt (Daten werden nicht gezeigt).

3.2.3 Möglicher Mechanismus der N-SMase Inhibition durch die Verbindung 30

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Art der N-SMase Inhibition durch das Spiroepoxid 30 zeigen, daß das Epoxid am aktiven Zentrum des Enzyms bindet.

Eine kovalente Bindung des Inhibitors an das Enzym liegt zwar aufgrund der reaktiven Epoxid-Funktion nahe, wurde aber bisher noch nicht bewiesen.

In Abb. 19 ist ein Vorschlag für einen kovalenten Inhibitionsmechanismus dargestellt. Nukleophile Gruppen im aktiven Zentrum der N-SMase greifen am positiv polarisierten Kohlenstoffatom des Epoxids an, gleichzeitig wird die Bindung zum Sechsring gelöst. Letztendlich kommt es zur kovalenten Bindung zwischen dem Nukleophil und dem Kohlenstoff des Epoxids und zur Re-Aromatisierung des Sechsringes.

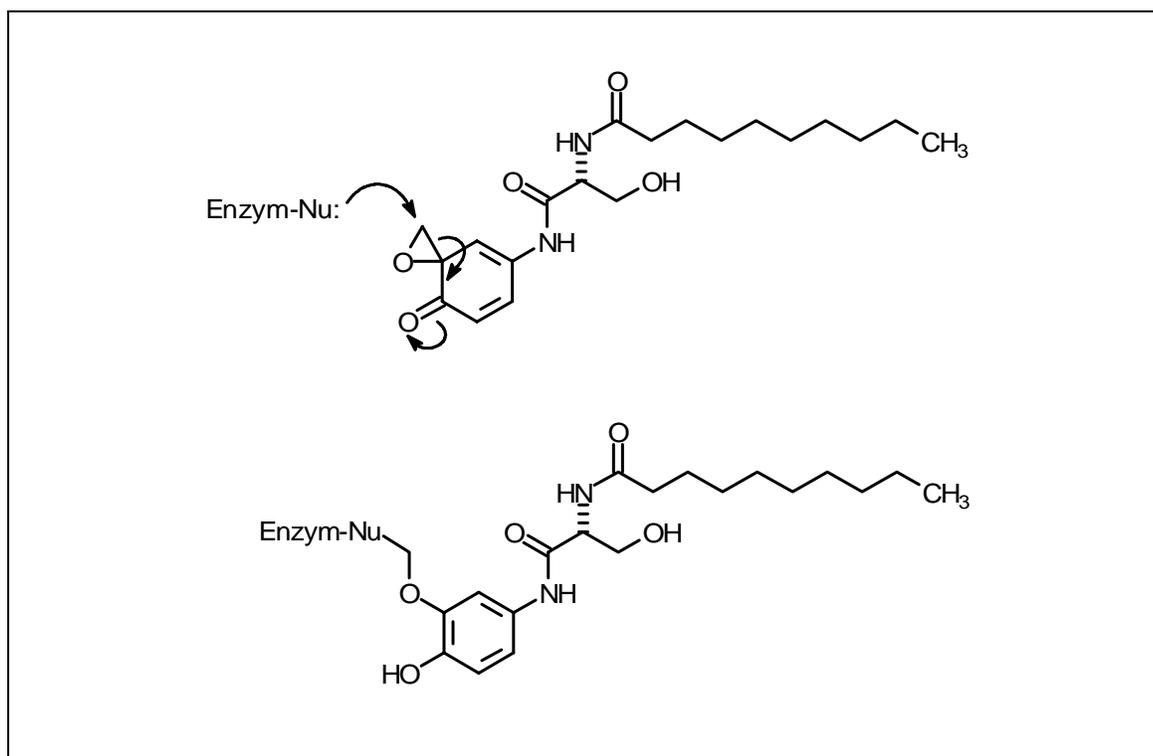


Abb. 19: Möglicher Mechanismus der N-SMase Inhibition durch das Epoxid 30

3.2.4 Synthese und enzymatischer Test des Epoxids 32

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der N-SMase durch das Spiroepoxid 30 auch durch eine einfachere Verbindung mit einer reaktiven Epoxidfunktion in ähnlicher Position erreicht werden kann, wurde das Epoxid 32 hergestellt (Abb. 20). Der enzymatische Test unter den

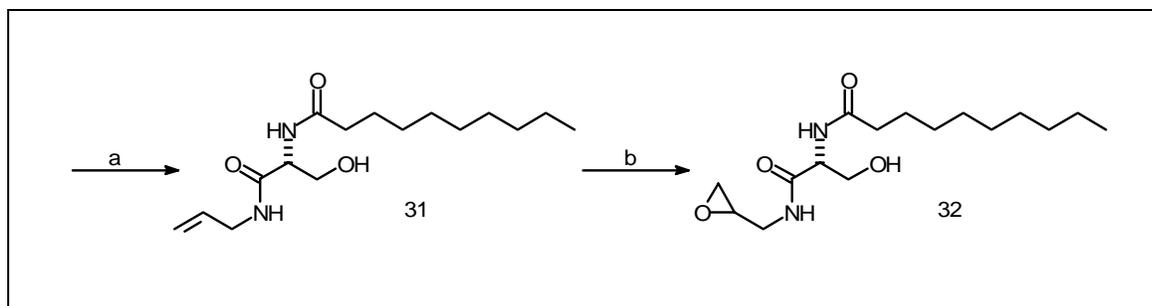
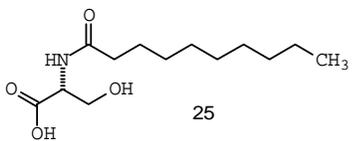
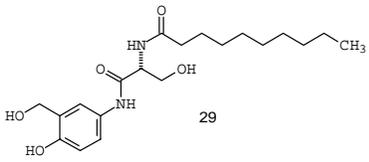
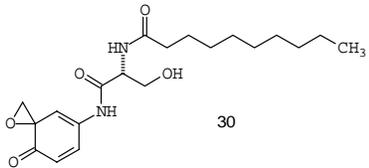
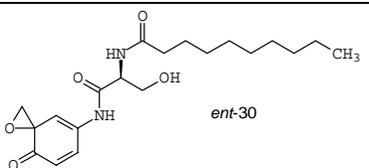
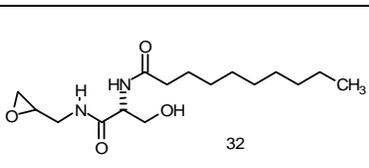


Abb. 20: Synthese des Epoxids 32 - Reagenzien und Reaktionsbedingungen:

a DCC, HOBT, 25, Allylamin, r.t., 16h, 67% b MCPBA, CH₂Cl₂, 0° C, 16 h, 88%

selben Bedingungen wie für das Spiroepoxid 30 zeigte, daß das Epoxid 32 eine wesentlich schwächere Inhibition der N-SMase von nur 17% (Konzentration 200 µM (100 µM Endkonzentration)) nach 90 Minuten Vorinkubationszeit bewirkt.

Getestete Verbindung	Inhibition / Konzentration	Herkunft
 25	N-SMase: Keine / 200 µM A-SMase: Keine / 200 µM	siehe Experimenteller Teil
 29	N-SMase: Keine / 200 µM A-SMase: Keine / 200 µM	siehe Experimenteller Teil
 30	N-SMase: Irreversible Inhibition (s. Abb.17) A-SMase: Keine / 500 µM mit 90 min Vorinkubation	siehe Experimenteller Teil
 ent-30	N-SMase: Inhibition Analog zu 30 A-SMase: Keine / 500 µM mit 90 min Vorinkubation	siehe Experimenteller Teil
 32	N-SMase: irreversible Inhibition, 17% / 200 µM (100 µM) bei 90 Minuten Vorinkubation. A-SMase: Keine / 200 µM bei 90 min Vorinkubation	siehe Experimenteller Teil

Tab. 2: Getestete Substanzen 25, 29, 30 und 32

3.2.5 Synthese des Spiroepoxids 30, ausgehend von *Boc*-D-Serin – eine Alternative

Mit der in Abb. 16 gezeigten Darstellung des N-SMase Inhibitors 30 wurde ein sehr kurzer, nur fünf Stufen umfassender Syntheseweg beschriftet, der es erlaubt, in kurzer Zeit größere Mengen an Inhibitor herzustellen. Ziel zukünftiger Forschung ist aber, mit Methoden der kombinatorischen Chemie eine große Zahl strukturell ähnlicher Verbindungen herzustellen.

Aus diesem Grunde wurde eine Alternative Synthese für das Spiroepoxid 30, bzw. dem Zwischenprodukt 29, ausgehend von *Boc*-D-Serin durchgeführt (Abb. 21), die den bequemen Zugang zu zahlreichen nur geringfügig veränderten Derivaten erlaubt.

So kann man, ausgehend von dem Zwischenprodukt 34, durch Abspaltung der *Boc*-Schutzgruppe und anschließende Acylierung, z.B. mit Säurechloriden, mit wenigen Schritten eine Vielzahl von Derivaten mit unterschiedlichen lipophilen Seitenketten herstellen. Andererseits ist auch der Einsatz verschiedener Anilinderivate möglich.

Über die freie Hydroxyfunktion könnte *Boc*-D-Serin über einen geeigneten Spacer an ein Harz gebunden werden, und die Reaktionen an fester Phase durchgeführt werden. Dadurch könnten zahlreiche Verbindungen ohne großen Reinigungsaufwand hergestellt werden.

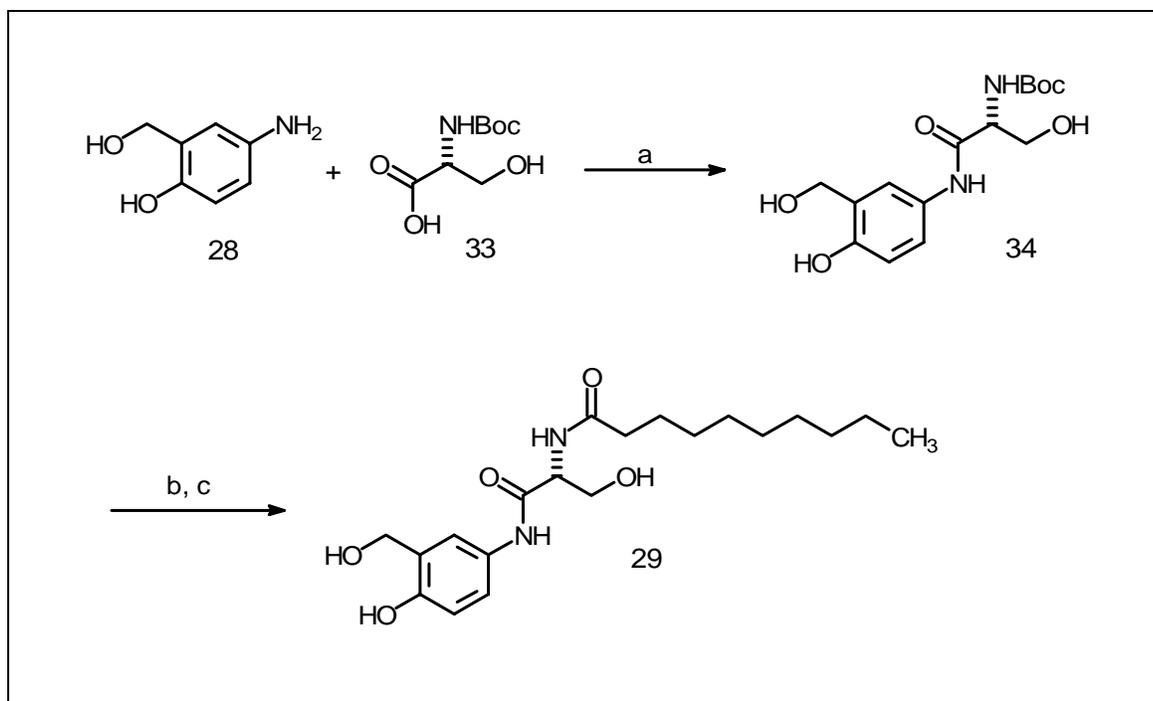


Abb. 21: Alternative Synthese der Zwischenstufe 29, ausgehend von *Boc*-D-Serin 33

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a DCC, HOBT, DMF, r.t., 16h, 70% b 5% TFA, CH₂Cl₂, r.t., 2 h c NaHCO₃, H₂O, THF, 5 h, 86%.

3.3 Synthese und enzymatischer Test der Ceramid-S-Analoga 37-39

Ausgehend von *S*-Methyl-L-cystein 35 a bzw. von L-Methionin 35 b wurden sechs verschiedene Ceramid-S-Analoga hergestellt. Nach einer Reduktion der entsprechenden Aminosäuren nach *Giannis* [85, 86] mit Lithiumborhydrid und Trimethylsilylchlorid in Tetrahydrofuran wurden die beiden Aminoalkohole 36 a und b unter Schotten-Baumann Bedingungen mit Decanoylchlorid versetzt. Die so erhaltenen Ceramid-S-Analoga 37 a, b wurden anschließend mit Natriumperiodat in Methanol / Wasser bzw. mit Wasserstoffperoxid-Lsg. in Eisessig zu den entsprechenden Sulfoxiden 38 a, b bzw. zu den Sulfonen 39 a und 39 b umgesetzt. Die Sulfoxide 38 a und b liegen nur als Diastereomeren-Gemische vor, eine Trennung mittels HPLC konnte aus Zeitmangel bisher noch nicht durchgeführt werden.

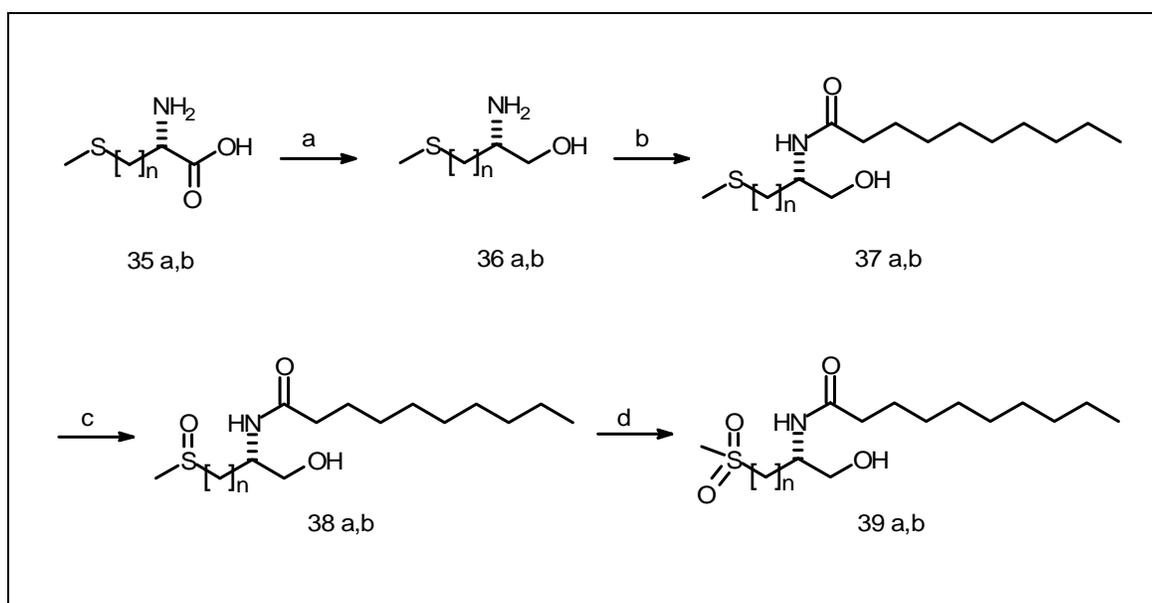


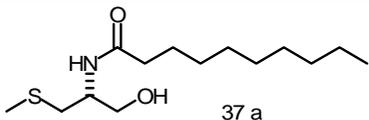
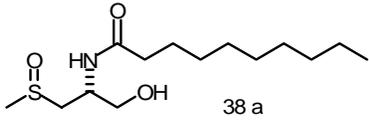
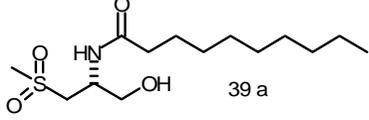
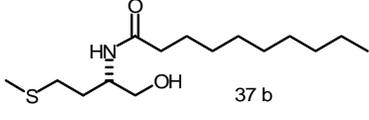
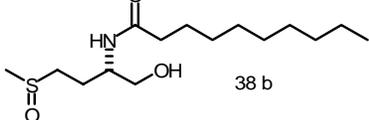
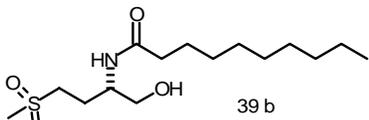
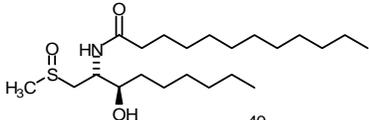
Abb. 22: Darstellung der Ceramid-S-Analoga 37-39 (a): n = 1 (b): n = 2

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a LiBH_4 , TMS-Cl, THF, r.t. 24 h (72% / 78%) b $\text{H}_{19}\text{C}_9\text{COCl}$, Na_2CO_3 , H_2O , CH_2Cl_2 , 16 h, (83% / 88%) c 0,5 M NaIO_4 aq., MeOH, 0 °C (71% / 91%) d 30% H_2O_2 , HOAc, 80 °C, 3h, r.t., 14 h (92% / 95%)

Die Synthese der Verbindungen 37-39 wurde ins Auge gefaßt, da sich das strukturell ähnliche, aber wesentlich aufwendiger herzustellende MSDH-Cer 6 bereits als Ceramid-Analogon mit interessanten biochemischen Eigenschaften erwiesen hatte. Darüber hinaus hatten bereits *Liu* und *Hannun* gezeigt, daß einfache Derivate von Cystein, wie γ -Glutamylcystein und Glutathion als Moderate N-SMase Inhibitoren wirken.[12]

Der enzymatische Test der Substanzen zeigte, daß die Derivate des *S*-Methylcysteins inklusive dem Sulfoxid 40 allesamt moderate Inhibitoren (IC_{50} ca. 200 μ M) der N-SMase darstellen, unabhängig vom Oxidationsgrad des Schwefels (s. Tab. 3). Die Derivate des Methionins zeigten keinerlei Inhibition der N-SMase bzw. der A-SMase.

Erste biologische Untersuchungen durch Mitarbeiter von *Sandhoff* zeigten, daß das Sphingolipid-Muster von Neuronen des *Hippocampus* durch die Verbindungen 37-38 nicht signifikant verändert wird (vgl. Lit. [30, 31]).

<i>Getestete Verbindung</i>	<i>Inhibition / Konzentration</i>	<i>Herkunft</i>
 37 a	N-SMase: 48% / 200 μ M A-SMase: keine Inhibition	siehe Experimenteller Teil
 38 a	N-SMase: 53% / 200 μ M A-SMase: keine Inhibition	siehe Experimenteller Teil
 39 a	N-SMase: 50% / 200 μ M A-SMase: keine Inhibition	siehe Experimenteller Teil
 37 b	N-SMase: keine Inhibition A-SMase: keine Inhibition	siehe Experimenteller Teil
 38 b	N-SMase: keine Inhibition A-SMase: keine Inhibition	siehe Experimenteller Teil
 39 b	N-SMase: keine Inhibition A-SMase: keine Inhibition	siehe Experimenteller Teil
 40	N-SMase: 57% / 200 μ M A-SMase: keine Inhibition	Dipl. Arbeit Axel Huwe

Tab. 3: Inhibition durch die Ceramid-S-Analoga 37-40

3.4 Versuche zur Synthese eines konformativ fixierten Scyphostatin-Analogons

Die von *Lister et al.* angestellten Untersuchungen mit 3'-modifizierten Sphingomyelin Derivaten zeigen, daß das Sauerstoffatom an der 3'-Position des Sphingomyelins essentiell für eine Erkennung (Hydrolyse / Inhibition) durch die N-SMase ist (s. Kap. 2.5.1.1). Da die Inhibition des Epoxids 30 durch steigende Substrat-Konzentrationen abgeschwächt wird (vergl. Kap. 3.2.2), kann man vermuten, daß das Epoxid 30 als Sphingomyelin-Analogon von der N-SMase gebunden wird, und die OH Funktion des Epoxids funktionell der 3'-OH Gruppe des Sphingomyelins entspricht.

Die freie Drehbarkeit der Hydroxymethyl-Gruppe des Spiroepoxids 30 ermöglicht zum einen eine Faltung des Inhibitors in die vom Enzym geforderte Konformation, andererseits muß für eine korrekte Faltung des Spiroepoxids zusätzliche Energie aufgewendet werden.

Durch eine Verbrückung der Hydroxymethyl-Gruppe mit der lipophilen Seitenkette des Epoxids sollte die freie Drehbarkeit dieser Gruppe eingeschränkt und eine starr bzw. rigid ausgerichtete Hydroxy-Gruppe in einen potentiellen N-SMase Inhibitor wie z.B. 47 eingebaut werden. Je nach Ausrichtung der Hydroxy-Gruppe erhoffte man sich eine im Vergleich zu dem Epoxid 30 potentere Inhibition der N-SMase und wertvolle Informationen zur Struktur-Wirkungsbeziehung.

Als erster Syntheseschritt wurde die Kupplung von *N*-Benzylglycinethylester 41 mit Bernsteinsäureethylesterchlorid 42 in Anwesenheit von Kaliumhydrogencarbonat durchgeführt.^[87] Das resultierende Amid wurde durch Deprotonierung mit Kaliumhydrid in den cyclischen β -Ketoester 44 b überführt (Diekmann-Kondensation), dabei wurde das Enol 44 a als Nebenprodukt gebildet. Der als Enantiomeren-Gemisch erhaltene β -Ketoester 44 b wurde daraufhin bei 30 °C in einer Suspension von Bäckerhefe in Leitungswasser 5 Tage lang unter nicht-fermentierenden Bedingungen geschüttelt. Nach säulenchromatographischer Trennung von dem nicht umgesetzten *S*-Enantiomer von 44 b erhielt man das *threo*-Produkt 45 mit 94% Ausbeute und 98%ee (Literaturangabe ^[88]). Als nächster Schritt war zunächst die Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe mit Natrium in flüssigem Ammoniak geplant. Ein erster Versuch schlug jedoch aus unbekanntem Grund fehl, es wurden weder das Edukt, noch das gewünschte Produkt nachgewiesen, und konnte aus zeitlichen Gründen nicht wiederholt werden.

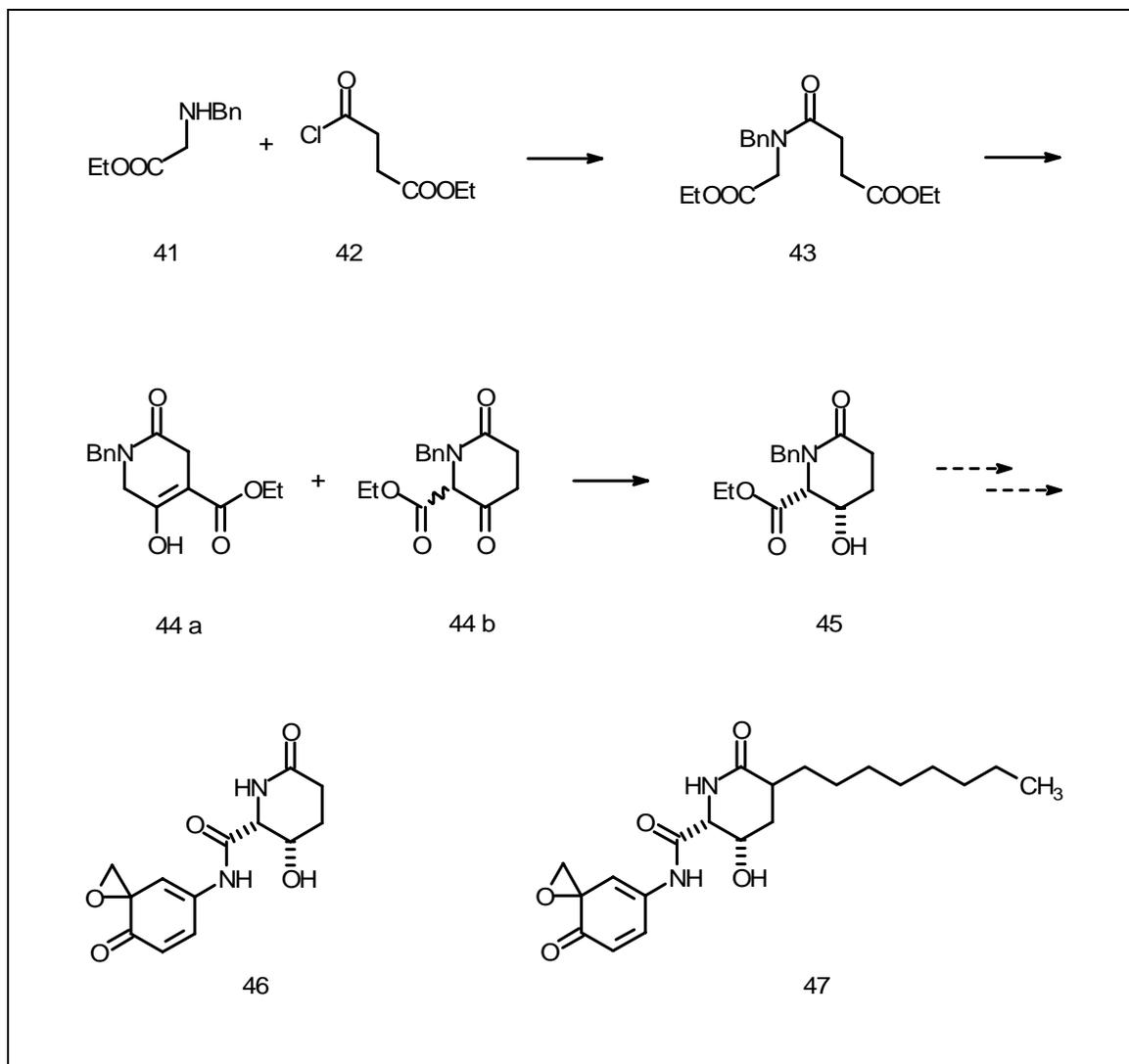


Abb. 23: Versuche zur Darstellung eines konformativ-fixierten potentiellen N-SMase Inhibitors

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a KHCO_3 Lsg. (aq.)/Toluen, r.t., 88% b KH, THF, 10 °C c Bäcker Hefe, Leitungswasser, 30 °C, 5 d, 96%.

Der eingeschlagene Syntheseweg scheint dennoch für die Darstellung von Verbindungen wie z.B. 46 und 47 geeignet zu sein, zumal das Produkt 45, sowie das Enantiomere kostengünstig in wenigen Schritten hergestellt werden können. Die Methode von *Mitsunobu* bietet darüber hinaus die Möglichkeit der Epimerisierung am C-3-Atom, wodurch alle Stereoisomere von 45 in reiner Form darstellbar sind.

3.5 Identifizierung und Charakterisierung von Manumycin A und Analoga als selektive Inhibitoren der Neutralen Sphingomyelinase

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Scyphostatin und dem Spiroepoxid 30 zu dem bekannten Antibiotikum Manumycin A 48,^[89-91] lag die Frage nahe, ob Manumycin A ebenfalls ein Inhibitor der N-SMase sei. Im enzymatischen Test zeigte Manumycin A in der Tat eine irreversible Inhibition der N-SMase, ähnlich der durch das Spiroepoxid 30 (Abb. 24). Die A-SMase wurde bei Konzentrationen bis zu 200 μM (Vorinkubation) nicht inhibiert. Darüber hinaus zeigte es sich, daß steigende Konzentrationen an Sphingomyelin im Assay den inhibitorischen Effekt abschwächten, was auf eine Konkurrenz zwischen Manumycin A und dem Substrat um die Bindung des aktiven Zentrums hinweist. Manumycin A ist ein potenterer Inhibitor der N-SMase als das Spiroepoxid 30; eine ebenso starke Inhibition wie diejenige durch die Verbindung 30 konnte schon bei einer Konzentration von 100 μM in der Vorinkubation, bzw. 50 μM im Assay, erreicht werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die kürzlich von der Arbeitsgruppe *Altenbach* synthetisierten Manumycin A Analoga 49-51 ^[92] ebenfalls auf eine mögliche N-SMase Inhibition überprüft.

In der Tat erwiesen sich die Verbindungen 49 a und 49 b als selektive irreversible N-SMase Inhibitoren, die Verbindungen 50 a und 50 b hingegen zeigten unter den selben Bedingungen weder eine Inhibition der N-SMase, noch der A-SMase (siehe Tab. 4).^[93]

Besonders interessant ist, daß die Art der Amid-Seitenkette einen starken Einfluß auf die inhibitorische Potenz der Verbindungen hat. Wie in Tab. 4 zu ersehen ist, zeigt die Verbindung 49 a eine wesentlich potentere Inhibition der N-SMase als 49 b, oder Manumycin A. Bereits ohne Vorinkubation wird die N-SMase bei einer Konzentration von 50 μM zu 90% inhibiert. Die Verbindung 49 b hingegen, wirkt ohne Vorinkubation kaum inhibierend, nach 60 Minuten Vorinkubation mit einer Konzentration von 100 μM und einer Assaykonzentration von 50 μM (s. Kapitel 3.1.2) wird die N-SMase zu 88% gehemmt. Das acetylierte Derivat 51 zeigt nur mit Vorinkubation von einer Stunde unter den selben Bedingungen eine Inhibition der N-SMase um 50%.

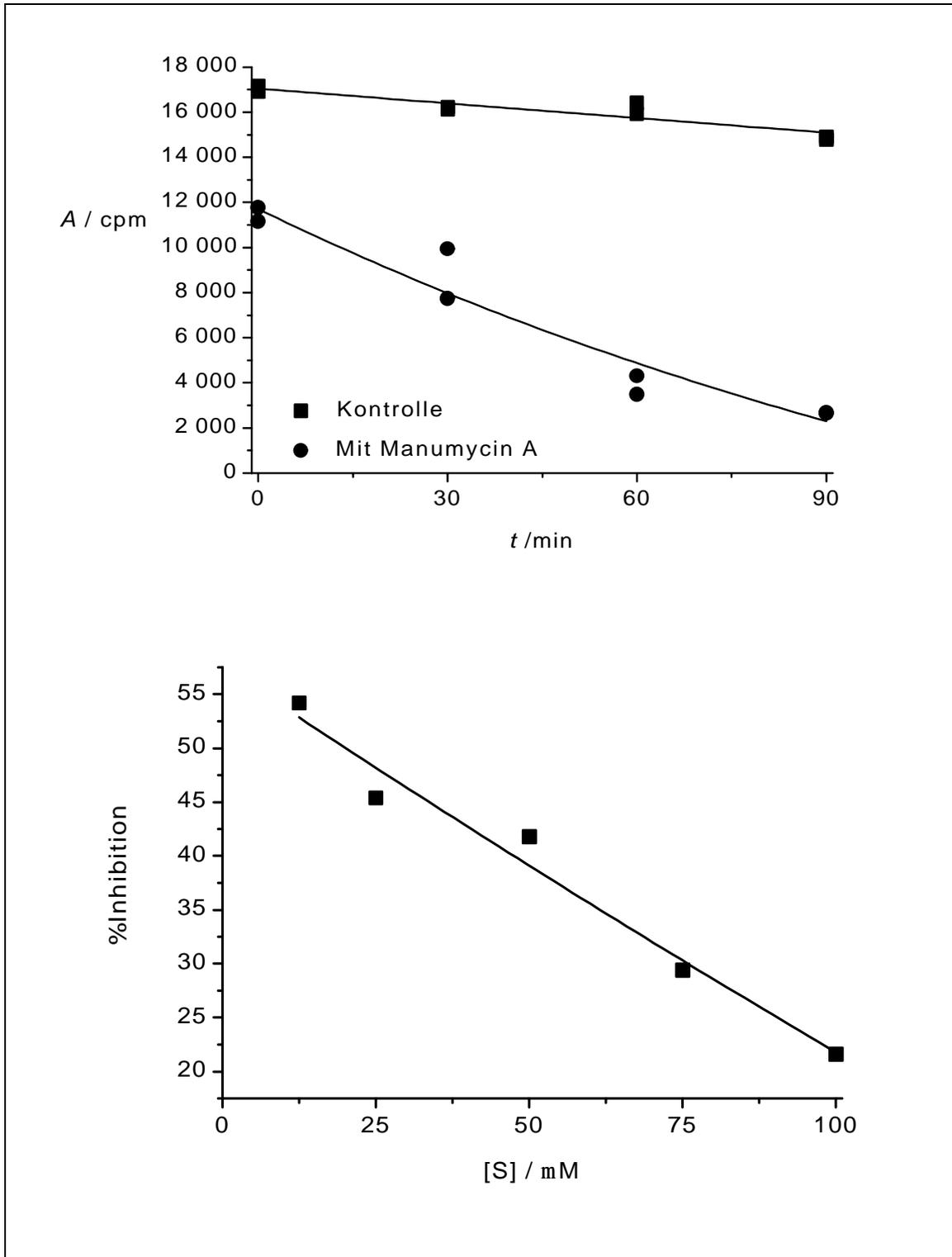
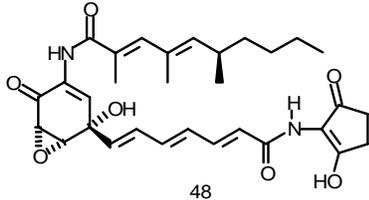
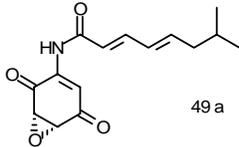
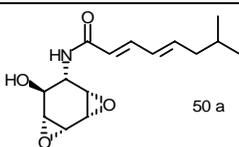
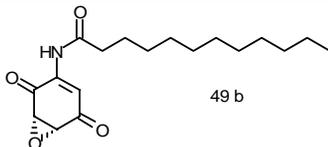
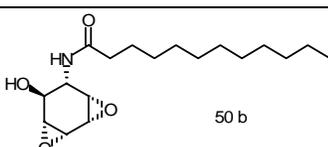
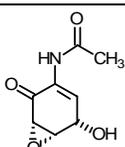


Abb. 24: Oben: Zeitabhängige Inhibition der N-SMase Manumycin A (50 μ M) A = Aktivität [cpm] t = Vorinkubationszeit Unten: Substratabhängigkeit der Inhibition durch Manumycin A (t = 0).

<i>Getestete Verbindung</i>	<i>Inhibition / Konzentration</i>	<i>Herkunft</i>
 <p>48</p>	Irreversible Inhibition der N-SMase (s. Abb. 24): 34% / 50 μM ohne Vorinkubation 79% / 50 μM 60 min Vorinkubation A-SMase: Keine Inhibition	Alexis Corp., Grünberg
 <p>49 a</p>	Irreversible Inhibition der N-SMase 90% / 50 μM ohne Vorinkubation 98% / 50 μM 60 min Vorinkubation A-SMase: Keine Inhibition	Arbeitsgruppe H.-J. Altenbach
 <p>50 a</p>	Keine Inhibition bei 200 μM	Arbeitsgruppe H.-J. Altenbach
 <p>49 b</p>	Irreversible Inhibition der N-SMase 10% / 50 μM ohne Vorinkubation 88% / 50 μM 60 min Vorinkubation A-SMase: Keine Inhibition	Arbeitsgruppe H.-J. Altenbach
 <p>50 b</p>	Keine Inhibition bei 200 μM	Arbeitsgruppe H.-J. Altenbach
 <p>51</p>	Irreversible Inhibition der N-SMase keine / 50 μM ohne Vorinkubation 50% / 50 μM 60 min Vorinkubation A-SMase: Keine Inhibition	Arbeitsgruppe H.-J. Altenbach

Tab. 4: N-SMase Inhibition durch Manumycin A 48 und die Analoga 49-51

Manumycin A ist als ein Naturstoff mit antibiotischen,^[94] anti-Tumor-^[95] und anti-inflammatorischen^[96] Eigenschaften bekannt. Diese Eigenschaften sind bisher auf die Inhibition der Ras-Farnesyltransferase (FTase, kompetitive Inhibition, $\text{IC}_{50} = 35 \mu\text{M}$ (Ratten FTase)) zurückgeführt worden. Die FTase ist für die Prozessierung des Ras Proteins essentiell und ist eins der am intensivsten untersuchten Targets für die Entwicklung von neuen Medikamenten gegen Krebs. Die Überprüfung der Verbindungen 49-50 im Hinblick auf eine eventuelle FTase Inhibition durch die Arbeitsgruppe von Waldmann zeigte, daß 50 a und 50 b keine Inhibitoren der FTase sind. Die Verbindungen 49 a und 49 b hingegen inhibieren die FTase nach einem kompetitiven Inhibitionsmuster mit IC_{50} Werten von 8.4 μM und 0.85 μM (Manumycin A $\text{IC}_{50} = 19,4 \mu\text{M}$).

Diese Ergebnisse legen nahe, daß einige der biologischen Effekte des Manumycin A möglicherweise aus der Inhibition der N-SMase resultieren. Darüber hinaus ist es möglich, daß die durch die N-SMase Inhibition hervorgerufenen Effekte durch die Inhibition der FTase amplifiziert werden, da es Hinweise für einen „*crosstalk*“ zwischen den Ras- und den Ceramid-Signalwegen gibt (siehe Abb. 6).

3.6 Synthese der Michael-Akzeptoren 54 a und 54 b als potentielle N-SMase Inhibitoren

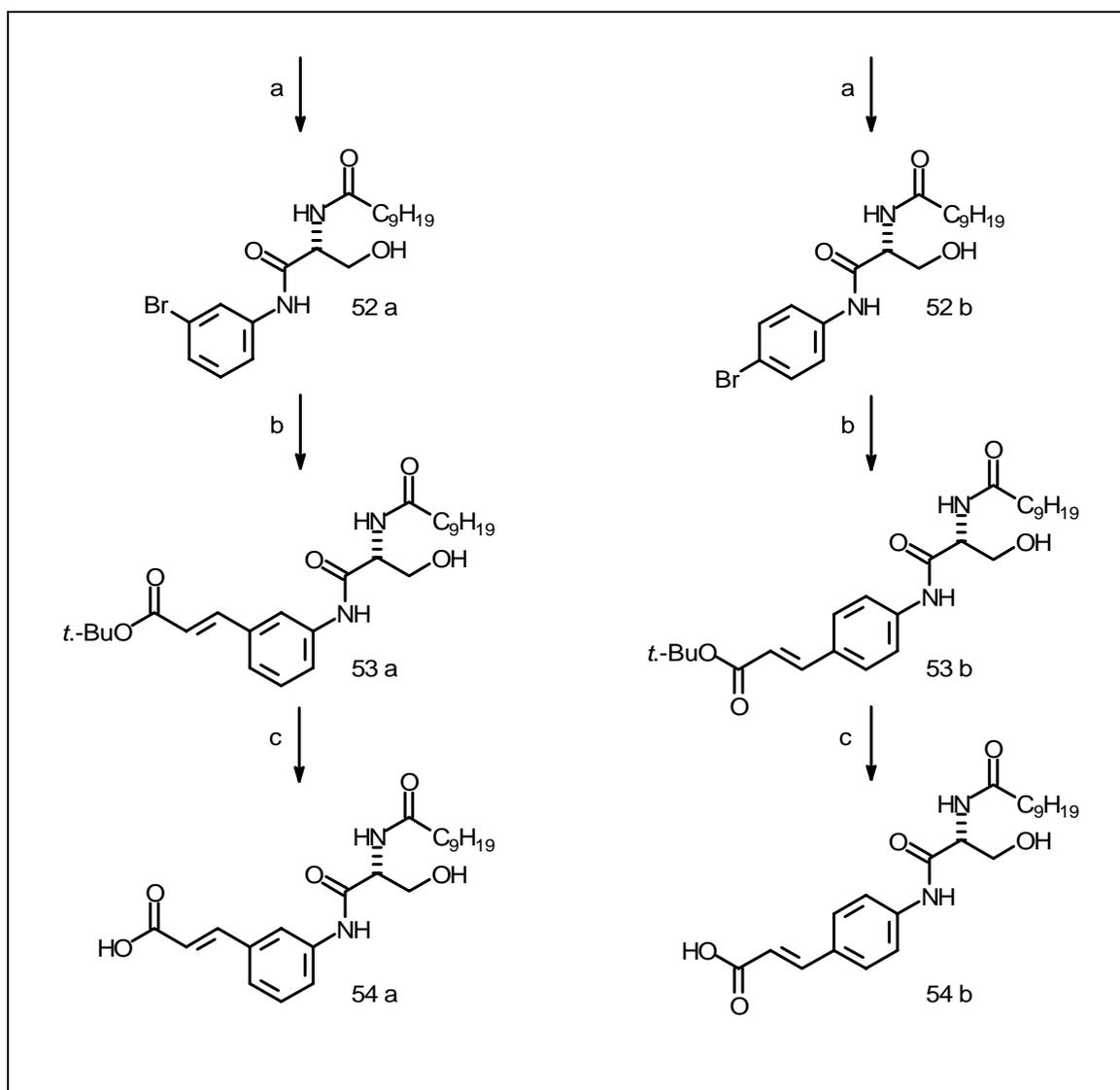


Abb. 25: Synthese der Michael-Akzeptoren 54 a,b als potentielle N-SMase Inhibitoren

Reagenzien und Bedingungen: a $C_6H_4BrNH_2$, 25, DCC/HOBT, (62% / 72%) b $H_3C_2COOt.Bu$, Ph_3P , $Pd(OAc)_2$, Et_3N , H_3C_2CN , reflux, 2 d (79% / 82%) c 10% TFA, CH_2Cl_2 , 24 h (72% / 65%)

Zur Darstellung weiterer potentieller N-SMase Inhibitoren wurde die Synthese der Verbindungen 54 a und 54 b ins Auge gefaßt.

Dazu wurde *N*-Decanoyl-D-serin mit 3-Bromanilin bzw. mit 4-Bromanilin über die Aktivestermethode gekoppelt. Die entstandenen Bromverbindungen 52 a und b wurden dann in einer Heck Reaktion mit *tert.*-Butylacrylat umgesetzt. Daraus resultierten die *E*-konfigurierten Produkte 53 a, b im großen Überschuß, die *Z*-Produkte wurden daher bei der Säulen-chromatographischen Trennung verworfen. In einem letzten Schritt wurden die *tert.*-Butylester Gruppen mit Trifluoressigsäure gespalten. Die resultierenden Produkte 54 a und 54 b wurden aus Zeitgründen noch nicht auf eine Inhibition der N-SMase überprüft.

Die Verbindungen 54 a und 54 b stellen potentielle N-SMase Inhibitoren dar, da sie nach einem Mechanismus, ähnlich dem in Abb. 19 vorgestellten nukleophilen Angriff des Epoxids 30, von passenden Nukleophilen in einer Art Michael Reaktion angegriffen werden könnten (Abb. 26). Die Michael-Akzeptoren 54 a, b sind in sofern interessant, da sie im Falle einer Inhibition der N-SMase weitaus stabilere Inhibitoren als das Epoxid 30 darstellen würden, und darüber hinaus auch den in Abb. 19 vorgeschlagenen Mechanismus bestätigen würden.

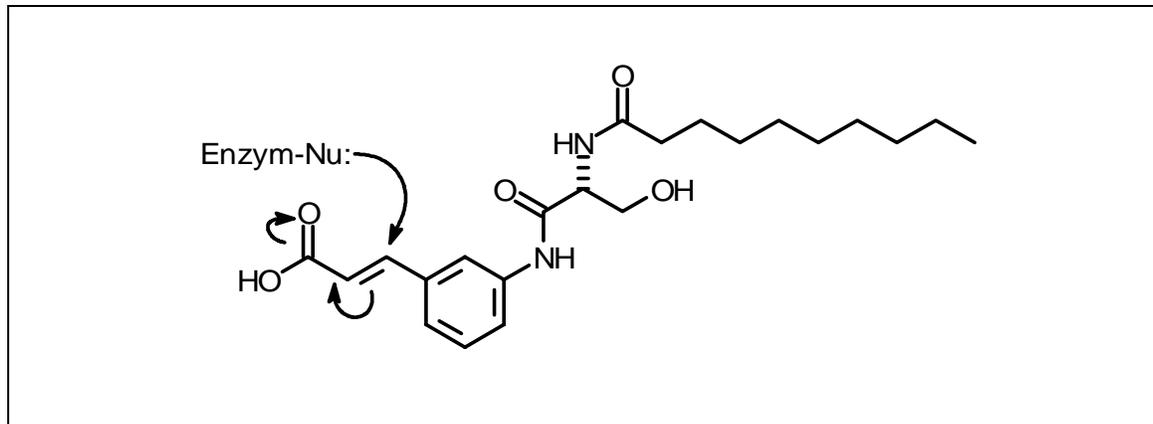


Abb. 26: Der Michael Akzeptor 54 a als potentieller kovalenter N-SMase Inhibitor:

3.7 Synthese des Salicylsäure-Derivats 59

Ebenfalls als potentieller N-SMase Inhibitor wurde das Salicylsäure Derivat 59 hergestellt, ein enzymatischer Test steht jedoch noch aus. Diese Verbindung ist aufgrund des Fehlens besonders reaktiver Gruppen, kaum als kovalenter Inhibitor geeignet. Im Falle einer kompetitiven Inhibition der N-SMase wäre ein guter Grundstein für die Entwicklung potenter kompetitiver Inhibitoren gelegt. Aus diesem Grunde wurde die Synthese so durchgeführt, daß

auf der Stufe der Verbindung 57 eine Umsetzung mit verschiedenen Säurechloriden umgesetzt werden kann. Wegen Zeitmangels und wegen des erhöhten Aufwandes der Reinigung vieler verschiedener Derivate wurde jedoch nur das decanoylierte Derivat 59 hergestellt.

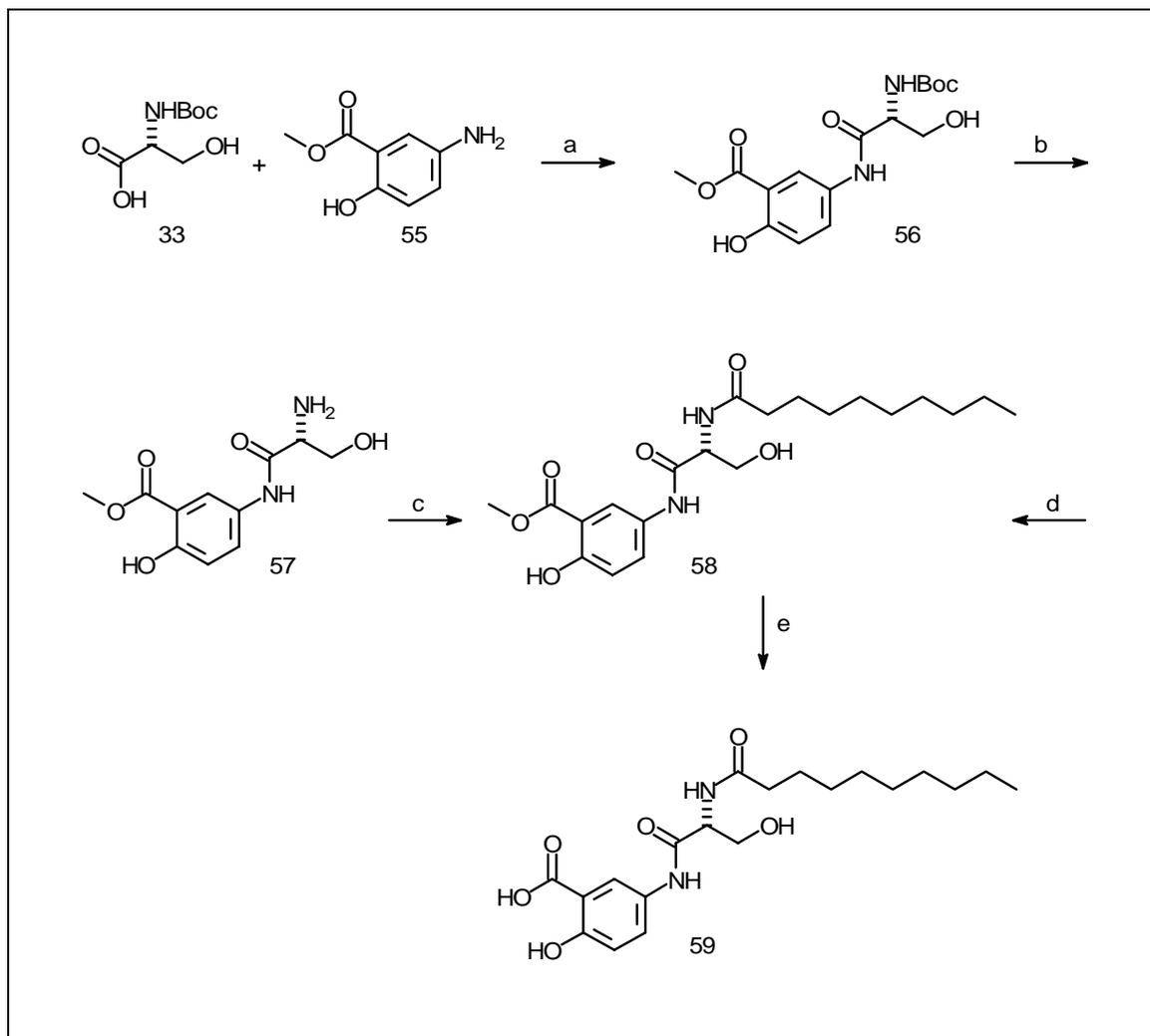


Abb. 27: Darstellung des Salicylsäure-Derivats 59 als potentieller N-SMase Inhibitor

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a DCC, HOBT, DMF, 16h, 54% b 5% TFA in CH₂Cl₂, 2 h c C₉H₁₉COCl, NaHCO₃, H₂O, THF, 83% d 25, 55 DCC, HOBT, DMF, 81% e 1M NaOH Lsg. (aq.), MeOH, Reflux, 94%

Boc-D-Serin 33 wurde nach einer Vorschrift *Taylor et al.*^[97] in quantitativer Ausbeute hergestellt. 5-Aminosalicylsäuremethylester 55 wurde aus der freien Säure durch Umsetzung mit Thionylchlorid in Methanol gewonnen. Nach einer Amid-Kopplung dieser beiden Komponenten unter Einsatz von DCC und HOBT wurde die resultierende Verbindung 56 mit 5%iger TFA in Methylenchlorid entschützt. Das freie Amin 57 wurde mit Decanoylchlorid

unter Schotten-Baumann Bedingungen acyliert. Das Intermediat 58 wurde zudem auch alternativ durch Kopplung von *N*-Decanoyl-D-Serin 25 mit dem Aminosalicysäureester 55 hergestellt (s. Abb. 27). Die anschließende Abspaltung des Methylesters gelang nur unter recht drastischen Bedingungen. Eine Umsetzung mit einem Äquivalent einer 1 M wäßrigen Natriumhydroxid Lösung in wenig Methanol wurde erst nach zweistündigem Erhitzen unter Rückfluß beobachtet. Wegen der Bildung von Neben-/Zersetzungsprodukten lieferte die Verseifung des Esthers nicht die üblichen, nahezu quantitativen, Ausbeuten.

3.8 Synthese von potentiellen Inhibitoren der *N*-Acetylneuraminsäure-Biosynthese

Ein gemeinsamer Baustein der Ganglioside, aber auch von verschiedenen Glykoproteinen ist die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Von der Inhibition der Neu5Ac verspricht man sich eine Unterbrechung verschiedener Kohlenhydrat-vermittelter Zell-Zell Interaktionen, wie sie z.B. bei der Invasion von Leukozyten in ein entzündetes Gewebe stattfinden.^[98]

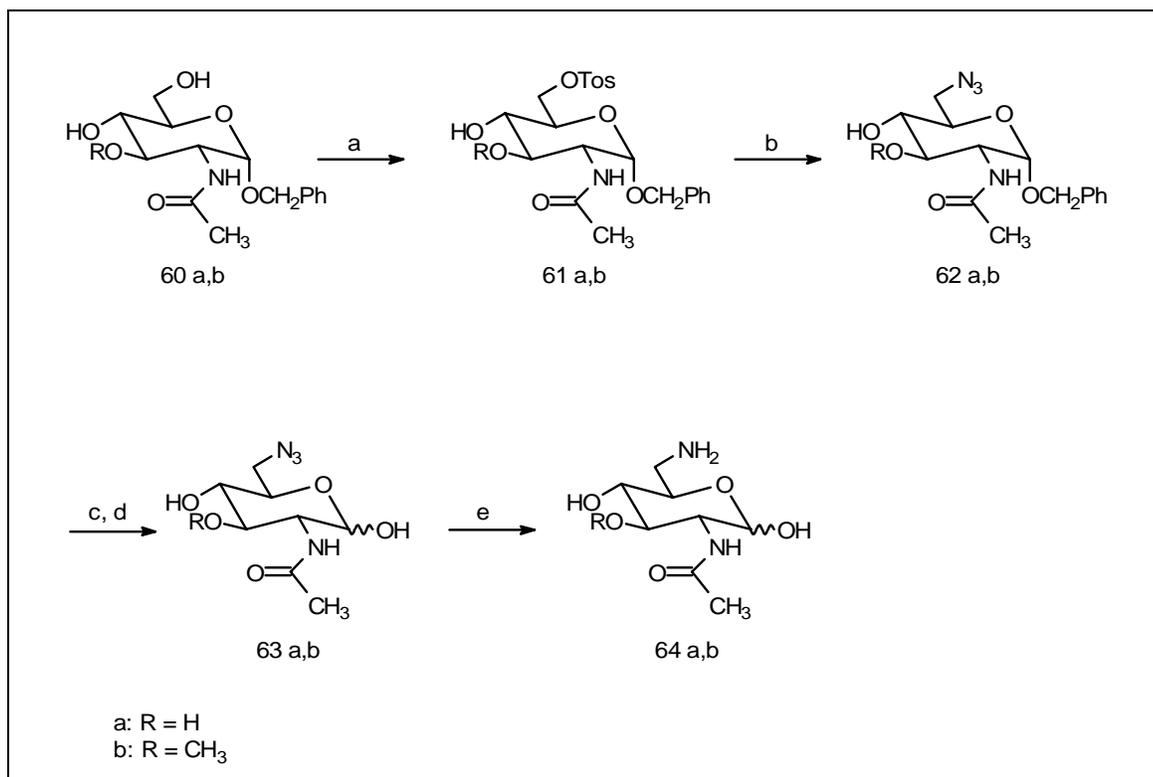


Abb. 28: Synthese des potentiellen Inhibitors der Neu5Ac-Synthese:

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a TosCl, Py, 0° C, 16 h, (76% / 78%) b NaN₃, DMF, 90 °C, 2-3 h, (80% / 77%) c 1 N HCl, 90 °C, 6 h d NaOMe, Ac₂O, Methanol, 4 °C, 16 h, (64% / 61%) e H₂/Pd, Methanol, 2 h, (85% / 90%)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese der Verbindungen 65 a und 65 b durchgeführt, und zusammen mit *P.N. Schröder* auf eine Inhibition der *N*-Acetyl-mannosamin-Kinase (ManNAc Kinase) und der 1-UDP-*N*-Acetyl-glucosamin-2-Epimerase (UDP-GlcNAc Epimerase) überprüft. Für die Ergebnisse siehe Dissertation (in Vorbereitung) von *P.N. Schröder*.^[99]

Die Synthese ging von den bereits im Arbeitskreis vorliegenden Vorstufen 60 a und b aus.^[100, 101] Nach einer regioselektiven Tosylierung in 6'-Position wurden die Verbindungen 61 a und b mit Natriumazid in DMF versetzt.^[102] Es wurde versucht, die resultierenden Azide in einem Schritt durch katalytische Hydrierung bei Drücken bis zu 200 Bar direkt in die an der anomeren Position entschützten Endverbindungen 64 a und 64 b zu überführen. Die Benzyl-Schutzgruppe konnte jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht hydrogenolytisch gespalten werden. Daher wurden die Azide zuerst mit Salzsäure behandelt. Dabei wurde sowohl die Benzylgruppe, als auch die (*N*-) Acetylgruppe abgespalten. Nach Neutralisation der Salzsäure wurde die freie Aminogruppe unter neutralen Bedingungen mit Acetanhydrid re-acetyliert. Im letzten Schritt wurden dann die Azido-Verbindungen 63 a und 63 b bei Normaldruck katalytisch (Pd/C) hydriert.

4 Ausblick

Die Verbindungen 30 und 49 a stellen aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften wertvolle Werkzeuge zur Aufklärung der biologischen Funktion der N-SMase und des Ceramids im Rahmen von Signaltransduktions-Prozessen dar. Sie könnten darüber hinaus zur Markierung des aktiven Zentrums der N-SMase herangezogen werden und somit Einblicke in den Reaktionsmechanismus dieses Enzyms, über den kaum Erkenntnisse vorliegen, ermöglichen.

Des weiteren können die Ergebnisse zur Entwicklung weiterer N-SMase-Inhibitoren hilfreich sein, zumal der in Abb. 21 dargestellte Syntheseweg auch an fester Phase durchgeführt werden kann, und so den Einsatz einer Vielzahl von Fettsäuren, Aminosäuren und funktionalisierten Anilinderivaten erlaubt (Abb. 29).

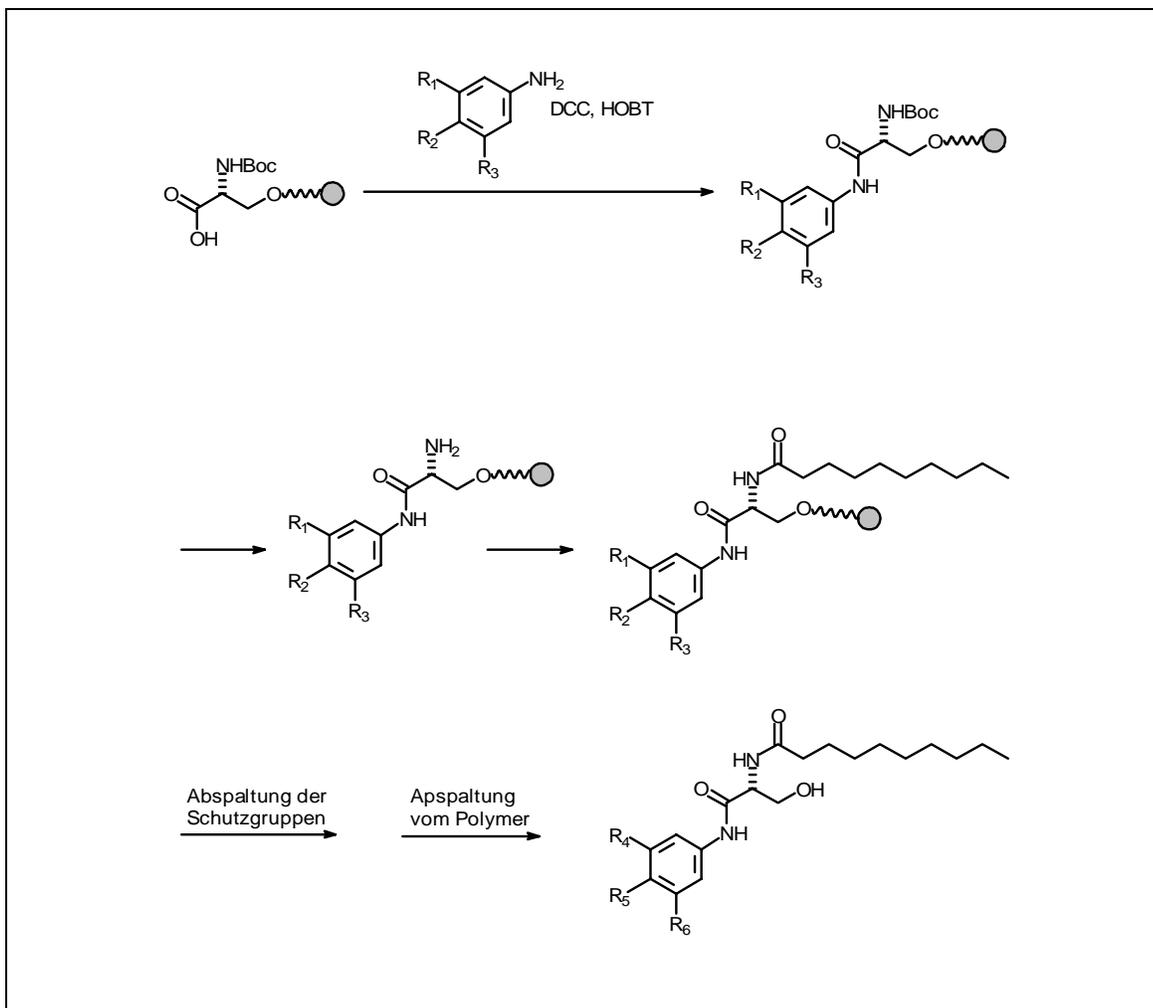


Abb. 29: Darstellung von potentiellen N-SMase Inhibitoren an fester Phase

Mit der Zahl der hergestellten Verbindungen wird allerdings auch die Notwendigkeit zunehmen, den vergleichsweise teuren radioaktiven SMase Assay z.B. durch einen fluorimetrischen Assay zu ersetzen. Fluoreszenzmarkierte Sphingomyelin Derivate sind beschrieben,^[103] darüber hinaus bietet die Firma *Molecular Devices* einen fluorimetrischen Sphingomyelinase Assay an.

Wie der Vergleich der inhibitorischen Potenz der Verbindungen 49 a und 49 b zeigt, ist neben anderen Strukturelementen auch die Beschaffenheit der lipophilen Seitenkette entscheidend für eine potente N-SMase Inhibition. Die Darstellung vieler verschiedener Derivate wird detailliertere Aussagen über die Struktur-Wirkungs-Beziehung zulassen.

Verschiedene mehrfach-ungesättigte Carbonsäuren sind käuflich, bzw. mit wenig Aufwand darstellbar. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit verschiedene stark verzweigte Carbonsäuren, wie die Tetramethyldecansäure (TMDS) 65, die aus der Bürzeldrüse von Flugenten isoliert werden können, und die im Arbeitskreis vorliegen für potentielle N-SMase Inhibitoren heranzuziehen.

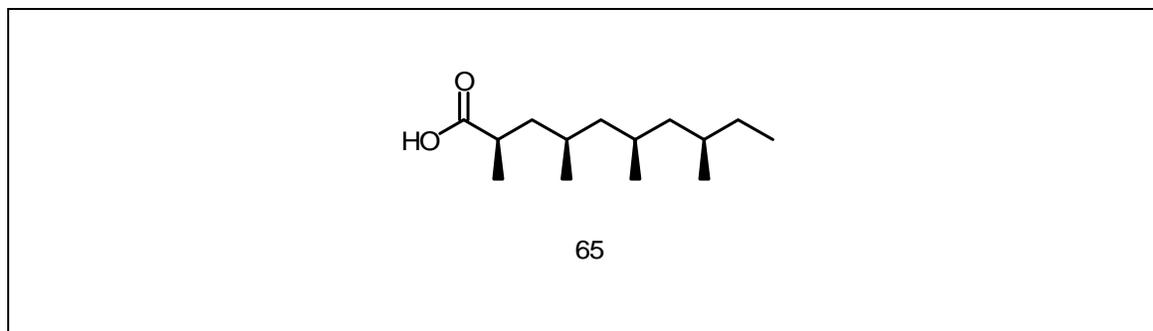


Abb. 30: (2R, 4R, 6R, 8R)-2, 4, 6, 8-Tetramethyldecansäure (TMDS) 65

Die Tatsache, daß Scyphostatin in Modellstudien eine ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung zeigt, rechtfertigt die Entwicklung von Sphingomyelinase-Inhibitoren, und macht die N-SMase zu einem interessanten Target in der experimentellen Therapie entzündlicher Erkrankungen, einschließlich Erkrankungen des Zentralnervensystems mit einer Autoimmunkomponente wie z.B. Multiple Sklerose.^[104]

5. Experimenteller Teil

5.1 Synthetische Arbeiten

5.1.1 Allgemeine Angaben:

NMR-Spektroskopie:

Die ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren wurden mit NMR-Spektrometern vom Typ AC 250, AM 400 oder DRX 500 der Firma Bruker bei Raumtemperatur aufgenommen.

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit folgenden Geräten vermessen:

Modell „Bruker AC-250“ : 250 MHz- ^1H -NMR

Modell „Bruker AM-400“ : 400 MHz- ^1H -NMR und 100.6 MHz- ^{13}C -NMR

Modell „Bruker advance DRX 500“ : 500 MHz- ^1H -NMR und 125.8 MHz- ^{13}C -NMR

Als interner Standard diente das Restprotonen-Signal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels.

^1H -NMR-Spektren

Angegeben ist die chemische Verschiebung δ in parts per million (ppm), die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz), sowie die integrierte Protonenzahl. Die Zuordnung der Signale wird durch einen kurzen Formelausschnitt gezeigt. Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, dt = Dublett von Triplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, br = verbreitertes Signal.

^{13}C -NMR-Spektren

Alle ^{13}C -NMR-Spektren wurden Breitband-entkoppelt gemessen. Die Signalzuordnung wurde durch DEPT-Experimente (135° und 90°) unterstützt. Angegeben ist die chemische Verschiebung δ in ppm und ein Formelausschnitt, der die Zuordnung der Signale andeutet.

Massenspektren:

Die EI-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT MS70 mit einer Ionisierungsspannung von 70 eV aufgenommen.

Elementaranalyse:

Elementaranalysen wurden an einem Heraeus CHN-Rapid Gerät gemessen.

Schmelzpunkte:

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren mit einem Büchi 535 Schmelzpunkt-Bestimmungsgerät ermittelt und sind nicht korrigiert

Chromatographie:

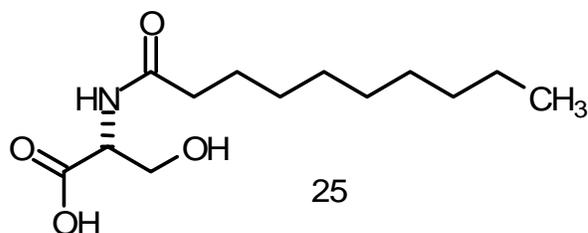
Für die Säulen- bzw. Dünnschicht-Chromatographie wurde Kieselgel (40-63 μm) der Firmen Merck (Darmstadt) oder Macherey & Nagel (Düren) sowie mit Kieselgel (40-63 μm) beschichtete Aluminium-Folien der Firma Merck verwendet.

Chemikalien:

Die Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Fluka (Deisenhofen), Aldrich (Steinheim) oder Acros (Niddenvau) bezogen.

5.1.2 Experimentelle Vorschriften:

5.1.2.1 Synthese von *N*-Decanoyl-D-serin 25



Ansatz:

D-Serin	2,10 g (20,0 mmol)
Decanoylchlorid	5,00 ml (4,66 g , 24,4 mmol)
Natriumcarbonat	3,18 g (30,0 mmol)
Tetrahydrofuran	20 ml
Wasser	50 ml

Ausbeute: 3,73 g (14,4 mmol, 72%)

Durchführung:

2,10 g (20,0 mmol) D-Serin 24 werden zusammen mit 3,18 g (30,0 mmol) Natriumcarbonat in 50 ml Wasser suspendiert. Dazu gibt man 20 ml Tetrahydrofuran und fügt unter starkem Rühren fünfmal im Abstand von jeweils einer Stunde je 1,00 ml (0,93 g, 4,87 mmol) Decanoylchlorid 23 hinzu. Nachdem noch über Nacht gerührt wurde wird das Tetrahydrofuran am Rotationsverdampfer abdestilliert. Anschließend säuert man mit konz. Salzsäure auf pH 1-2 an (Vorsicht, schäumt stark !). Der dabei gebildete Niederschlag wird abfiltriert, getrocknet und aus Diethylether umkristallisiert. Man erhält 3,73 g (14,4 mmol, 72%) eines weißen Feststoffs.

R_f (Dichlormethan/Methanol 5:1) = 0,17

Smp.: 80°C, Literatur: [105] 80-81°C

 $^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 500 MHz)

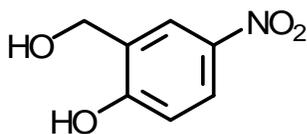
d [ppm] = 0,83 (t, 3H, $J = 6,8\text{Hz}$, CH_3), 1,18-1,25 (m, 12H, $6\times\text{CH}_2$), 1,46 (m, 2H, CH_2), 2,12 (t, 2H, $J = 7,5\text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{C=O}$), 3,59 (dd, 1H, $J = 4,2\text{ Hz} + 11,0\text{ Hz}$, CHHOH), 3,65 (dd, 1H, $J = 5,3\text{ Hz} + 11,0\text{ Hz}$, CHHOH), 4,24 (m, 1H, CH_α), 7,89 (d, 1H, $J = 7,8\text{ Hz}$, NH).

 $^{13}\text{C-NMR-DEPT}$ ([D6]-DMSO, 125 MHz)

d [ppm] = 14,00 (CH_3), 22,23 (CH_2), 25,35 (CH_2), 28,77 (CH_2), 28,83 (CH_2), 28,99 (CH_2), 29,07 (CH_2), 35,20 (CH_2) 54,74 (CH), 61,59 (CH_2), 172,27 (C), 127,53 (C).

HR-MS (140°C) berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_4(\text{M}^+)$: $m/z = 259,1783$ gef.: $m/z = 259,1794$.

5-Nitrosalicylalkohol 27



27

Ansatz:

2-Hydroxy-5-aminobenzaldehyd 26	10,0 g (59,8 mmol)
Natriumborhydrid	2,00 g (52,8 mmol)
Ethanol	300 ml

Ausbeute: 10,1 g (59,2 mmol, 99%)

Durchführung:

Man löst 10,0 g (59,8 mmol) 2-Hydroxy-5-aminobenzaldehyd 26 in 300 ml Ethanol und fügt 2,00 g (52,8 mmol) Natriumborhydrid hinzu. Dann rührt man 24 h und gibt zuerst 5 ml Wasser und anschließend solange halbkonz. Schwefelsäure hinzu, bis sich die Lösung fast vollständig entfärbt. Anschließend werden die anorg. Salze abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer abdestilliert. Danach wird der Rückstand noch einmal in 200 ml Methanol aufgenommen und das Lösungsmittel erneut vollständig eingedampft. Zuletzt wird aus Wasser umkristallisiert. Man erhält ca. 10,1 g (59,2 mmol) eines gelbbraunen Feststoffs.

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0,54

Smp.: 128 °C Literatur: [106] 125-126 °C.

 $^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD, 500 MHz):

d [ppm] = 4,66 (s, 2H, CH₂OH), 6,85 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H_{arom.}), 8,01 (dd, 1H, $J = 2,9$ Hz und 8,6 Hz, H_{arom.}), 8,25 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz, H_{arom.}).

 $^{13}\text{C-NMR DEPT}$ (CD₃OD, 125 MHz):

d [ppm] = 59,73 (CH₂), 115,52 (CH), 124,50 (CH), 125,36 (CH), 130,41 (C), 141,75 (C), 162,02 (C).

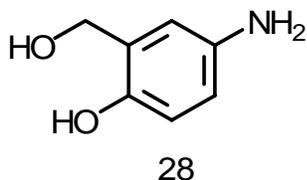
HR-MS (140°C): Berechnet für C₁₃H₂₅NO₄(M⁺): $m/z = 259,1783$ gef.: $m/z = 259,1794$.

Elementaranalyse:

Berechnet: C 49,71 % H 4,17 % N 8,28 %

Gefunden: C 49,39 % H 4,23 % N 8,27 %

5-Aminosalicylalkohol 28



I. Katalytische Hydrierung

Ansatz:

2-Hydroxymethyl-4-nitrophenol 27	4,25 g, 25,0 mmol
Methanol	150 ml

Ausbeute: 3,37 g (24,2 mmol, 97%)

Durchführung:

Zu einer mit Argon gesättigten Lösung von 4,25 g (25,0 mmol) 2-Hydroxymethyl-4-nitrophenol 27 in 150 ml Methanol werden 2 Spatelspitzen Palladium auf Aktivkohle (10%ig) gegeben. Dann wird die Lösung zweimal evakuiert und jeweils mit Wasserstoff belüftet. Unter Wasserstoffatmosphäre wird nun unter Normaldruck 5 h gerührt. Anschließend wird die Aktivkohle über Celithe abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der feste gelbe Rückstand wird roh weiter eingesetzt. Da das Produkt recht instabil ist, muß es direkt unter Argon gesetzt werden.

II. Reduktion mit Indium

Ansatz:

2-Hydroxymethyl-4-nitrophenol 27	425 mg (2,50 mmol)
Indium Pulver	2,00 g (27,4 mmol)
Ammoniumchlorid-Lösung (ges.)	3 ml
Ethanol	5 ml

Ausbeute: 316 mg (2,27 mmol, 91%)

Durchführung:

Zu einer Lösung von 425 mg (2.50 mmol) 2-Hydroxymethyl-4-nitrophenol 27 in 5 ml Ethanol werden 3 ml einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung gegeben. Danach werden 2,00 g (17.4 mmol) Indium Pulver hinzugefügt und 3 h unter Rückfluß erhitzt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) werden die Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand in trockenem Methanol re-suspendiert. Die unlöslichen Bestandteile werden dann abfiltriert und der Rückstand wird einer säulenchromatographischen Reinigung unterworfen (Dichlormethan/Methanol 7:1). Man erhält 316 mg (2.27 mmol, 91 %) des Anilin Derivats 28 als braunen Feststoff.

III. Reduktion mit Natriumdithionit

Ansatz:

2-Hydroxymethyl-4-nitrophenol 27	8,00 g (47,3 mmol)
Natriumdithionit	40,0 g (229 mmol)
Wasser	300 ml
Methanol	200 ml

Ausbeute: 4,53 g (32,6 mmol, 69%)

Durchführung:

In einem Gemisch aus 300 ml Wasser und 200 ml Methanol werden 8,00 g (mmol) 2-Hydroxymethyl-4-nitrophenol 27 und 40,0 g (229 mmol) Natriumdithionit gelöst und die Mischung 6 Tage gerührt. Nachdem Reaktion beendet ist werden die Lösungsmittel vollständig entfernt und der Rückstand in 150 ml Methanol gründlich suspendiert. Anschließend werden die unlöslichen Salze abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 7:1). Man erhält das Anilin 28 als gelben Feststoff (4,53 g, 32,6 mmol, 69%).

R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0.31;

 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz):

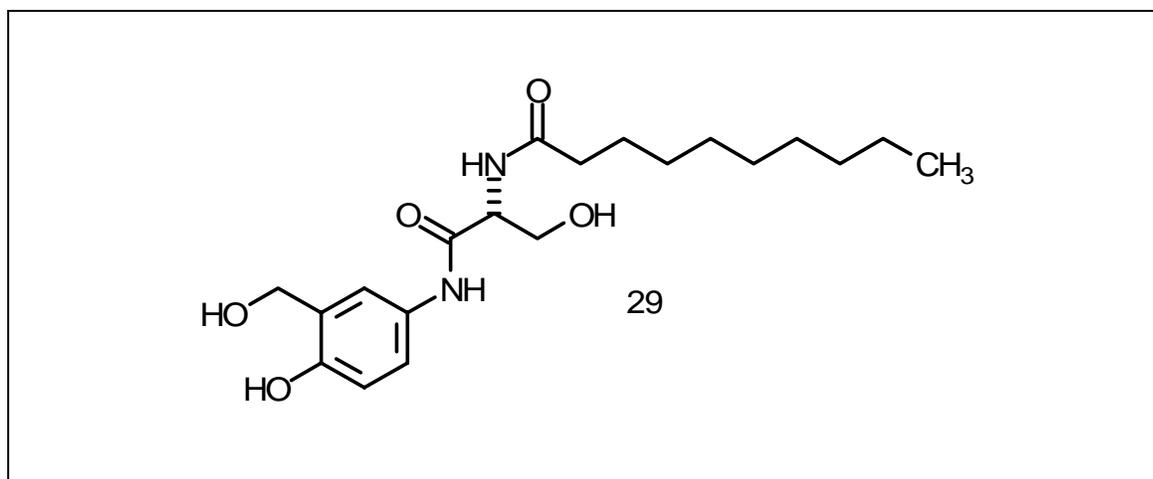
d [ppm] = 4,79 (s, 2H, CH_2), 6,95 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,07 (dd, 1H, $J = 2,4$ Hz und 8,2 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,28 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$).

HR-MS (110 °C) Berechnet für $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_2(\text{M}^+)$: $m/z = 139.0633$ gefunden: $m/z = 139.0629$.

Allgemeine Vorschrift zu Amidkopplung mit DCC/HOBT

Jeweils 1 Äq. des Amins und der entsprechenden Säure werden zusammen mit 1,1 Äquivalenten HOBT in THF oder DMF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Dann werden unter Rühren 1,1 Äquivalente DCC hinzugegeben und 1 h bei 0° C und anschließend weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird aufgearbeitet, indem man den entstandenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und den Rückstand säulenchromatographisch reinigt. Sollte das Produkt trotz säulenchromatographischer Trennung noch mit Dicyclohexylharnstoff verunreinigt sein, wird aus Dichlormethan umkristallisiert.

Decansäure-[2-hydroxy-1-(*R*)-(4-hydroxy-3-hydroxymethylphenylcarbamoyl)-ethyl]-amid 29

Ansatz:

<i>N</i> -Decanoyl-D-serin 25	777 mg (3,00 mmol)
4-Amino-2-hydroxymethylphenol 28	417 mg (3,00 mmol)
HOBT	445 mg (3,30 mmol)
DCC	680 mg (3,30 mmol)
DMF	15 ml

Ausbeute: 696 mg (1,83 mmol, 61%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Amidkopplung mit DCC/HOBT

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0,27

Smp.: 164°C

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz):

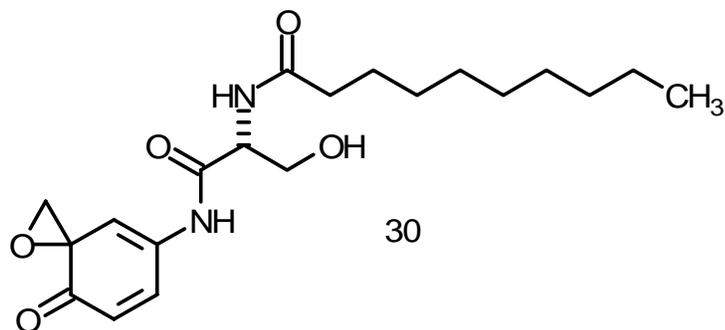
d [ppm] = 0,73 (t, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3), 1,08-1,15 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,35 (m, 2H, CH_2), 2,03 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3,47 (m, 2H, CHCH_2OH), 4,31 (d, 2H, $J = 5,5$ Hz, CHCH_2OH), 4,79 (m, 1H, CH_α), 4,78-4,90 (m, 2H, $2 \times \text{OH}$), 6,53 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,21 (dd, 1H, $J = 2,1$ Hz und $8,5$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,35 (dd, 1H, $J = 1,6$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,73 (d, $J = 7,9$ Hz, NH), 9,01 (s, 1H, NH), 9,53 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100,6 MHz):

d [ppm] = 13.99 (CH_3), 22.15 (CH_2), 25.26 (CH_2), 28.72 (CH_2), 28.81 (CH_2), 28.89 (CH_2), 28.97 (CH_2), 31.34 (CH_2), 35.20 (CH_2), 55.65 (CH), 58.17 (CH_2), 61.88 (CH_2), 114.19 (CH), 118.84 (CH), 119.25 (CH), 128.64 (C), 130.60 (C), 150.07 (C), 168.47 (C), 172.37 (C).

HR-MS (195°C) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5(\text{M}^+)$: $m/z = 380,2311$ gef.: $m/z = 380,2292$.

Decansäure [2-hydroxy-1-(*R*)-(8-oxo-1-oxaspiro[2,5]octa-4,6-dien-5-ylcarbamoyl)-ethyl]-amid 30



Ansatz:

Decansäure-[2-hydroxy-1-(<i>R</i>)-(4-hydroxy-3-hydroxymethylphenylcarbamoyl)-ethyl]-amid 29	100 mg (0,26 mmol)
0,3 M Natriumperiodat-Lösung aq.	2,00 ml (0,60 mmol)
Dichlormethan/Methanol 3:2	10 ml

Ausbeute: 69,8 mg (0,18 mmol, 70%)

Die Verbindung 29 (100 mg, 0,26 mmol) wird in 10 ml einer Mischung von Dichlormethan und Methanol (Verhältnis 3:2) gelöst. Dazu gibt man 2,00 ml (0,60 mmol) einer frisch angesetzten 0,3 M Natriumperiodat-Lösung und läßt die Reaktionsmischung 5 Stunden unter Lichtauschluß rühren. Anschließend werden die Phasen getrennt und die Oberphase noch dreimal mit ca. 15 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat dampft man das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 12:1). Man erhält 69,8 mg (0,18 mmol, 70%) eines braunen Feststoffs.

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0,49

 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz):

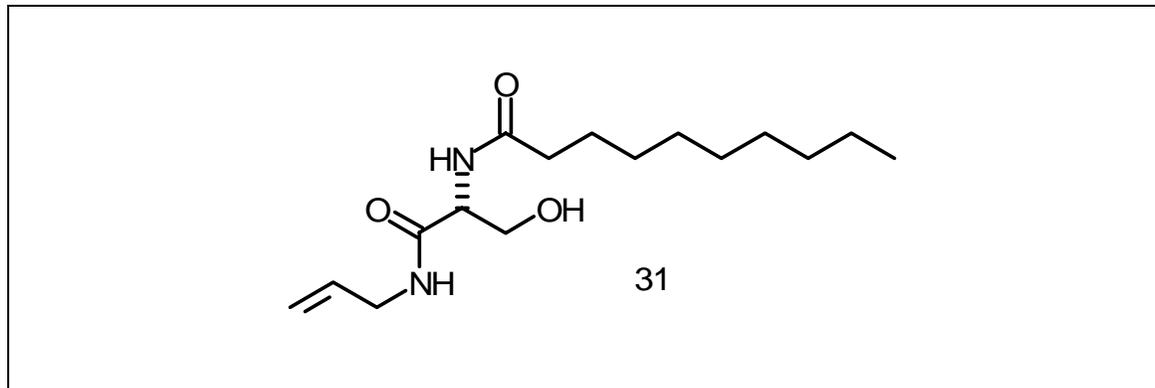
d [ppm] = 0.85 (t, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH_3), 1.23 (m, 12 H, $6 \times \text{CH}_2$), 1.57 (m, 2 H, CH_2) 2.21 (t, 2 H, $J = 7.5$ Hz, COCH_2), 3.65 (m, 1 H, $\text{CHH}_{\text{epox.}}$), 3.86 (m, 2 H, $\text{COCHH}_{\text{epox.}}$, CHHOH), 4.31-4.49 (m, 3 H, H- α , OH, CHHOH), 6.29 (d, 0.47 H, $J = 3.5$ Hz, H_{ring}), 6.32 (d, 0.47 H, $J = 3.2$ Hz, H_{ring}), 6.77 (b, 0.47 H, H_{ring}), 6.79 (b, 0.53 H, H_{ring}), 6.93-7.05 (m, 2 H, H_{ring} , NH), 8.00 (s, 0.53 H, NH) 8.03 (s, 0.47 H, NH).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz):

d [ppm] = Haupt-Diastereomer: 14.1, 22.6, 25.6, 29.2, 29.3, 29.4, 31.8, 36.3, 54.7, 59.4, 62.5, 80.1, 130.6, 138.7, 140.3, 144.6, 170.1, 174.7, 185.2. Charakteristische Signale des Neben-Diastereomers: $\delta = 54.8, 59.3, 62.6, 80.0, 130.4, 138.4, 144.4, 170.2, 174.8, 185.1$.

HR-MS (155°C) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5(\text{M}^+)$: $m/z = 378,2154$ gef.: $m/z = 378,2139$.

5.1.2.2 Synthese des Epoxids 32

Decansäure (1-(*R*)-allylcarbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-amid 31Ansatz:

<i>N</i> -Decanoyl-D-serin 25	1,30 g (5,00 mmol)
Allylamin	374 μ l (285 mg, 5,00 mmol)
HOBT	741 mg (5,50 mmol)
DCC	1,13 g (5,50 mmol)
DMF	15 ml

Ausbeute: 1,00 g (3,35 mmol, 67%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Amidkopplung mit DCC/HOBT

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0,47

Smp.: 78 °C

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

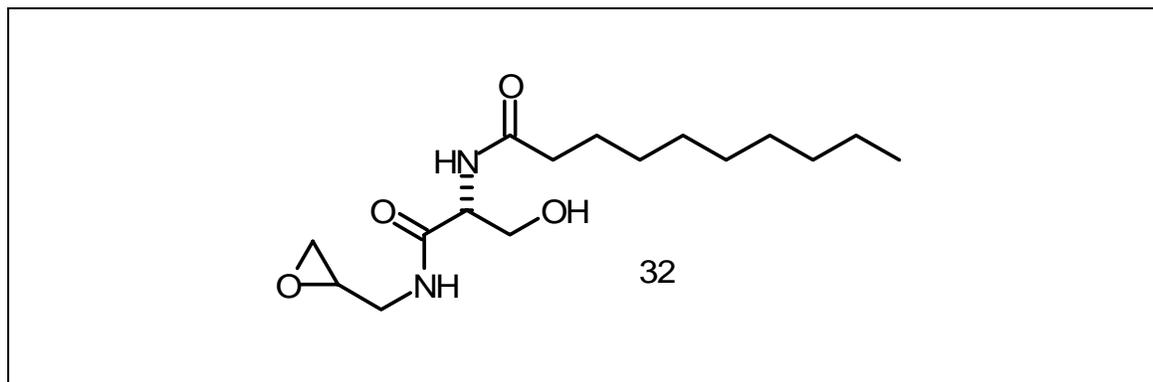
d [ppm] = 0,87 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH_3), 1,21-1,33 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,63 (m, 2H, CH_2), 2,26 (t, 2H, $J = 8,1$ Hz), 2,75 (br, 2H,), 3,62 (dd, 1H, $J = 3,1$ Hz und 11,0 Hz), 3,87 (m, 2H,) 4,12 (d, 1H, $J = 10,6$ Hz,), 4,47 (m, 1H,), 5,14 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz, = CHH) 5,18 (d, 1H, $J = 16,6$ Hz, = CHH), 5,81 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6,80 (br, 1H, NH), 7,15 (br, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3)

d [ppm] = 14,08 (CH₃), 22,64 (CH₂), 25,57 (CH₂), 29,19 (CH₂), 29,24 (CH₂), 29,30 (CH₂), 29,40 (CH₂), 31,83 (CH₂), 36,40 (CH₂), 41,77 (CH₂), 53,66 (CH), 62,74 (CH₂), 116,44 (CH₂), 133,41 (CH), 171,12 (C), 174,58 (C).

HR-MS (90°C) berechnet für C₁₆H₃₀N₂O₃(M⁺): m/z = 298,2256 gef.: m/z = 298,2267.

Decansäure [2-hydroxy-1-(*R*)-(oxiranylmethyl-carbamoyl)-ethyl]-amid 32



Ansatz:

Decansäure	(1-(<i>R</i>)-allylcarbamoyl-2-hydroxy-	900 mg (2,86 mmol)
	ethyl)-amid 31	
m-Chlorperbenzoesäure		1,10 g (6,37 mmol)
Dichlormethan		15 ml

Ausbeute: 791 mg (2,52 mmol, 88%)

Durchführung:

Zu einer Lösung von 900 mg (2,86 mmol) des Allylamids 31 in 15 ml trockenem Dichlormethan werden unter Eiskühlung 1,10 g (6,37 mmol) m-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt, wobei sich das Eisbad langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird der Niederschlag abfiltriert, und das Filtrat mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Danach wird die Methylenechlorid Phase getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert.

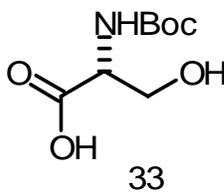
R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0,43

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

d [ppm] = 0,86 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH_3), 1,19-1,30 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,62 (m, 2H, CH_2), 2,28 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,61 (ddd, 1H, $J = 2,9$ Hz, 4,6 Hz und 13,8 Hz), 2,77 (ddd, 1H, $J = 1,5$ Hz, 4,6 Hz und 8,5 Hz,), 3,09 (m, 1H,), 3,35-3,41 (m, 1H,), 3,64-3,72 (m, 1H,), 4,04-4,08 (m, 1H,), 4,55 (m, 1H, CH_α), 7,17 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz, NH), 7,42 (dd, 1H, $J = 5,7$ Hz und 12,0 Hz, NH),

HR-MS (90°C) berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4(\text{M}^+)$: $m/z = 314,2205$ gef.: $m/z = 314,2189$.

N-Boc-D-serin 33



Ansatz:

D-Serin 24	10,2 g (98,0 mmol)
Di- <i>tert.</i> -butyldicarboxylat	25,3 g (118 mmol)
1 M Natriumhydroxid Lösung	200 ml (200 mmol)
Dioxan	100 ml

Ausbeute: 19,7 g (96,1 mmol, 98%)

Durchführung:

Die Durchführung erfolgte nach einer Vorschrift von Taylor.^[97] Eine Lösung von 10,2 g (98,0 mmol) D-Serin in 200 ml 1 M Natriumhydroxid-Lösung mit 100 ml Dioxan wird bei einer Temperatur von 0°C mit 25,3 g (118 mmol) Di-*tert.*-butyldicarboxylat versetzt. Man läßt auf Raumtemperatur erwärmen und läßt 2 Tage rühren. Dann wird das Dioxan am Rotationsverdampfer entfernt und die wäßrige Lösung mit Diethylether gewaschen. Anschließend gibt man 1 M Schwefelsäure hinzu, bis der pH-Wert 2-3 beträgt. Nach Sättigung der Lösung mit Kochsalz wird vier mal mit 200 ml Essigester extrahiert. Die

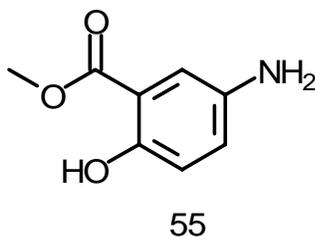
vereinigten organischen Phasen werden getrocknet und das Lösungsmittel wird entfernt. Man erhält 19,7 g (96,1 mmol, 98%) *Boc*-D-Serin als farbloses zähflüssiges Öl, das ohne weitere Reinigung eingesetzt wird.

R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,25

$^1\text{H-NMR}$ ([D₆]-DMSO, 250 MHz)

d [ppm] = 1,21 (s, 9H, *t*.Bu), 3,45 (d, 2H, $J = 4,9$ Hz, CH₂), 3,79 (m, 1H, CH_α), 6,54 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, NH).

5-Aminosalicylsäuremethylester 55



Ansatz:

5-Aminosalicylsäure	15,0 g (97,9 mmol)
Thionylchlorid	12,0 ml (19,7 g, 165 mmol)
Methanol	200 ml

Ausbeute: 12,4 g (74,2 mmol, 77%)

Durchführung:

Zu einer eisgekühlten Suspension von 15,0 g (97,9 mmol) 5-Aminosalicylsäure in 200 ml Methanol werden tropfenweise 12,0 ml (19,7 g, 165 mmol) Thionylchlorid zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird zwei Stunden bei Raumtemperatur und dann 5 Stunden in der Siedehitze gerührt. Anschließend werden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 350 ml einer 0,5 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung suspendiert. Dann schüttelt man dreimal mit Dichlormethan aus, trocknet die vereinigten

organischen Phasen über Natriumsulfat und destilliert anschließend das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wird noch einmal aus Wasser umkristallisiert. Man erhält 12,4 g (74,2 mmol, 77%) eines braunen Feststoffs.

R_f (Dichlormethan/Methanol 12:1) = 0,61

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 500 MHz):

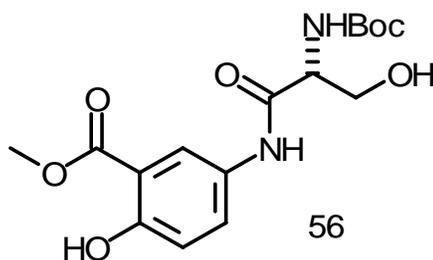
d [ppm] = 3,85 (s, 3H, OCH₃), 6,70 (d, 1H, J = 8,8 Hz, H_{arom.}), 6,81 (dd, 1H, J = 2,8 Hz + 8,8 Hz, H_{arom.}), 7,01 (d, 1H, J = 2,8 Hz, H_{arom.}), 9,74 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 125 MHz):

d [ppm] = 52,18 (CH₃), 112,12 (C), 112,83 (CH), 117,57 (CH), 123,12 (CH), 141,11 (C), 151,64 (C), 169,73 (C).

HR-MS (60°C) berechnet für C₈H₉NO₃(M⁺): m/z = 167,0582 gef.: m/z = 167,0573

5-(2-(*R*)-tert.-Butoxycarbonylamino-3-hydroxy-propionylamino)-2-hydroxybenzoesäuremethyl-ester 56



Ansatz:

<i>N</i> -Boc-D-serin	3,08 g (15,0 mmol)
5-Aminosalicylsäuremethylester	2,51 g (15,0 mmol)
HOBT	2,23 g (16,5 mmol)
DCC	3,40 g (16,5 mmol)
DMF	35 ml

Ausbeute: 2,84 g (8,01 mmol, 54%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Amidkopplung mit DCC/HOBT

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0,45

Smp.: 134°C

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO 500 MHz):

d [ppm] = 1,27 (s, 9H, *t*.Bu), 3,23 (s, 2H,), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 4,82 (m, 1H, CH_α), 6,62 (d, 1H, J = Hz, NH), 6,83 (d, 1H, J = Hz, H_{arom.}), 7,55 (dd, 1H, J = H_{arom.}), 8,04 (d, 1H, J = Hz, H_{arom.}), 9,83 (s, 1H, NH_{arom.}), 10,15 (s, 1H, OH_{arom.}).

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO 125 MHz):

d [ppm] = 28,18 (3xCH₃), 52,50 (CH₃), 57,31 (CH), 61,83 (CH₂), 78,29 (C), 112,39 (C), 117,51 (CH), 120,31 (CH), 127,51 (CH), 130,95 (C), 155,23 (C), 156,00 (C), 169,06 (C), 169,25 (C).

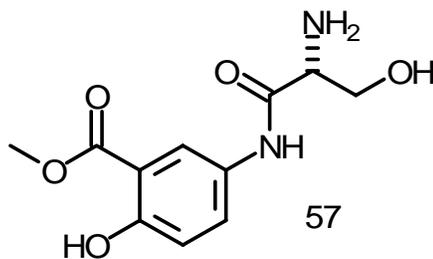
Elementaranalyse:

Berechnet: C 54,23 % H 6,26 % N 7,91 %

Gefunden: C 54,09 % H 6,44 % N 8,00 %

HR-MS (80 °C) berechnet für C₁₆H₂₂N₂O₇(M⁺): m/z = 354,1427 gef.: m/z = 354,1432

5-(2-(*R*)-amino-3-hydroxy-propionylamino)-2-hydroxybenzoesäuremethyl-ester 57



Ansatz:

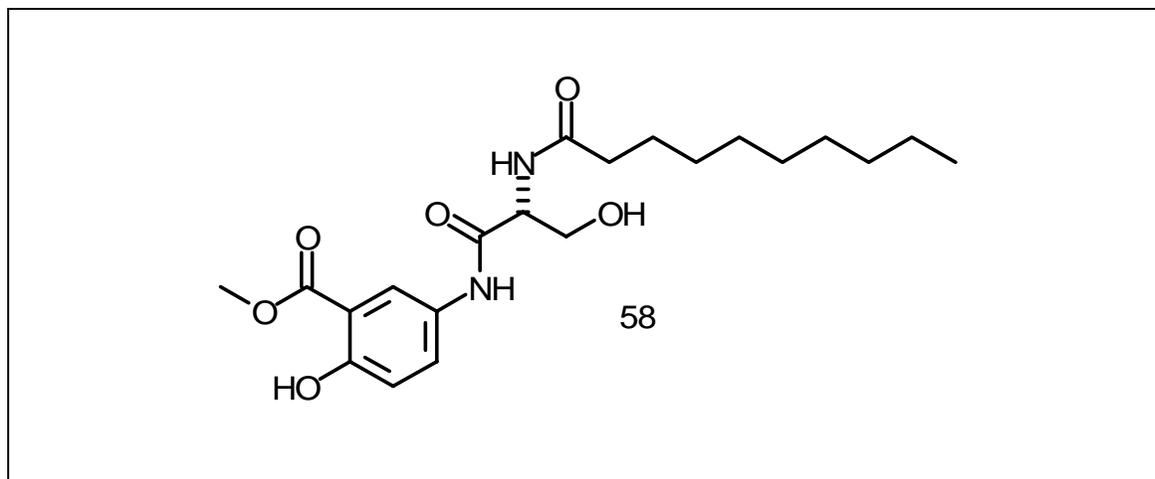
5-(2-(*R*)-*tert.*-Butoxycarbonylamino-3-hydroxy-propionylamino)-2-hydroxybenzoesäuremethyl-ester 56 2,84 g (8,01 mmol)
 5% (v/v) TFA in Dichlormethan 100 ml

Ausbeute: n.b.

Durchführung: Die Boc-geschützte Verbindung wird in 5% (v/v) TFA in Dichlormethan gelöst. Man läßt 2 Stunden rühren, und destilliert das Lösungsmittel ab.

Brauner Feststoff, läuft nicht auf dem DC

5-(2-(*R*)-Decanoylamino-3-hydroxypropionylamino)-2-hydroxybenzoesäuremethylester 58

Ansatz:

5-(2-(*R*)-amino-3-hydroxy-propionylamino)-2-hydroxybenzoesäuremethyl-ester (TFA Salz) 57 2,36 g (5,64 mmol)
 Decanoylchlorid 1,20 ml (1,12 g, 5,87 mmol)
 Natriumhydrogencarbonat 1,50 g (17,8 mmol)
 Wasser 50 ml
 THF 25 ml

Ausbeute: 1,91 g (4,68 mmol, 83%)

Durchführung: Das feste TFA-Salz wird zusammen mit 1,50 g (17,8 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 50 ml Wasser suspendiert. Dann werden 25 ml THF und anschließend 1,20 ml (1,12 g, 5,87 mmol) Decanoylchlorid hinzugegeben. Man rührt für weitere 4 Stunden destilliert am Rotationsverdampfer das THF ab und filtriert. Der Rückstand wird weitere 30 Minuten in heißer 0,2 M Natriumhydrogencarbonat gerührt. Dann läßt man abkühlen und filtriert erneut. Der so erhaltene gelbe Feststoff (1,91 g, 4,68 mmol, 83%) wird schließlich im Hochvakuum getrocknet.

R_f (Dichlormethan/Methanol 12:1) = 0,35

Smp.: 134 °C

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 500 MHz):

d [ppm] = 0,83 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH_3), 1,17-1,27 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,47 (m, 2H, CH_2), 2,14 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3,60 (m, 2H, CH_2OH), 3,88 (s, 3H, OCH_3), 4,38 (dd, 1H, $J = 6,0$ Hz + $13,8$ Hz, CH_α), 4,98 (br, 1H, OH), 6,93 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, H_{arom}), 7,67 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz + $8,9$ Hz, H_{arom}), 7,88 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, NH), 8,15 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H_{arom}), 9,94 (s, 1H, PhNH), 10,24 (b, 1H, PhOH).

$^{13}\text{C-NMR DEPT}$ ([D6]-DMSO, 125 MHz)

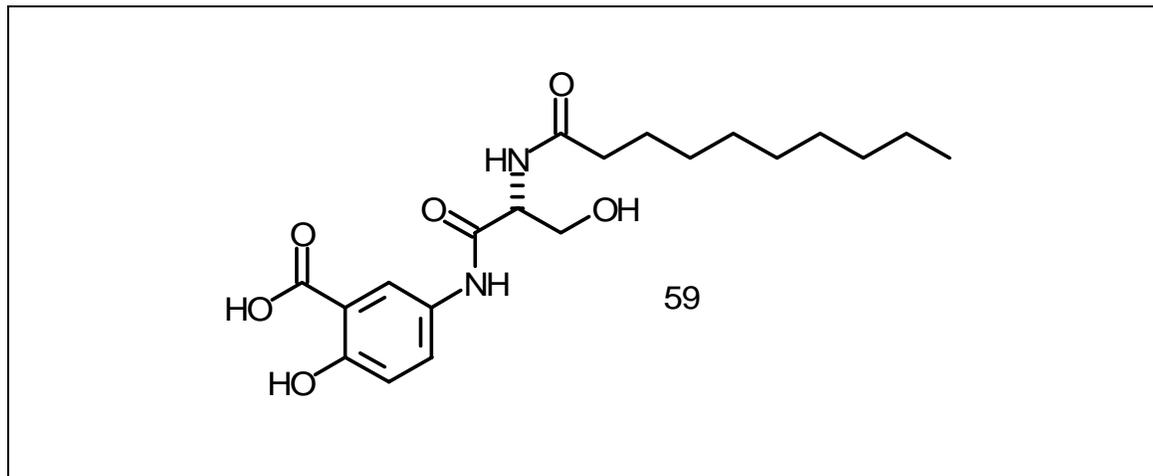
d [ppm] = 13,91 (CH_3), 22,06 (CH_2), 25,14 (CH_2), 28,63 (CH_2), 28,64 (CH_2), 28,80 (CH_2), 28,90 (CH_2), 31,26 (CH_2), 35,07 (CH_2), 52,45 (CH_3), 55,71 (CH), 61,64 (CH_2), 112,35 (C), 117,45 (CH), 120,33 (CH), 127,49 (CH), 130,89 (C), 155,99 (C), 169,01 (C), 169,08 (C), 172,36 (C) ppm.

Elementaranalyse:

Berechnet: C 61,75 % H 7,90 % N 6,86 %

Gefunden: C 60,99 % H 7,61 % N 6,80 %

HR-MS (150 °C) Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6(\text{M}^+)$: $m/z = 408,2260$ gef.: $m/z = 408,2266$.

5-(2-(*R*)-Decanoylamino-3-hydroxypropionylamino)-2-hydroxybenzoesäure 59Ansatz:

5-(2-(*R*)-Decanoylamino-3-hydroxypropionylamino)- 500 mg (1,22 mmol)

2-hydroxybenzoesäuremethylester 58

1 M Natriumhydroxid-Lösung 1,30 ml (1,30 mmol)

Methanol 5 ml

Ausbeute: 453 mg (1,15 mmol, 94%)

Durchführung:

Der Methylester 58 (500 mg, 1,22 mmol) wird in 5 ml Methanol suspendiert und mit 1,30 ml (1,30 mmol) 1 M Natronlauge versetzt. Man läßt 2 h bei Raumtemperatur und weiter 3 h unter Rückfluß rühren. Dann destilliert man das Lösungsmittel ab, nimmt man den Rückstand in 10 ml 0,5 M Salzsäure auf, und schüttelt dreimal mit Essigester aus. Nach Trocknung und Entfernung des Lösungsmittels erhält man 453 mg (1,15 mmol, 94%) eines weißen Feststoffs.

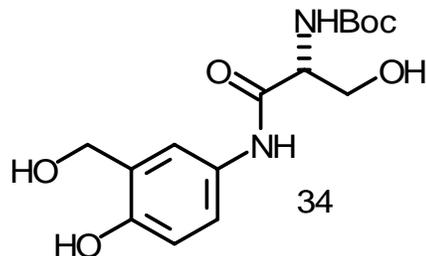
R_f (Dichlormethan/Methanol 12:1) = 0,15

 $^1\text{H-NMR}$ ([CD_3OD , 400 MHz):

d [ppm] = 0,83 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH_3), 1,17-1,27 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,47 (m, 2H, CH_2), 2,14 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3,60 (m, 2H, CH_2OH), 4,38 (dd, 1H, $J = 6,0$ Hz + 13,8 Hz, CH_α), 6,93 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, H_{arom}), 7,67 (dd, 1H, $J = 2,6$ Hz + 8,9 Hz, H_{arom}), 8,15 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H_{arom})

HR-MS (150 °C) Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6(\text{M}^+)$: $m/z = 408,2260$ gef.: $m/z = 408,2266$.

[2-Hydroxy-1-(*R*)-(4-hydroxy-3-hydroxymethyl-phenylcarbamoyl)ethyl]-carbamoylsäure-tert.-butylester 34



Ansatz:

<i>N</i> -Boc-D-serin 33	990 mg (4,83 mmol)
2-Hydroxymethyl-4-aminophenol 28	672 mg (4,83 mmol)
HOBT	802 mg (5,30 mmol)
DCC	1,09 g (5,30 mmol)
DMF	20 ml

Ausbeute: 1,10 g (3,38 mmol, 70%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Amidkopplung mit DCC/HOBT

R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,36

Smp.: 154 °C

$^1\text{H-NMR}$ ([D₆]-DMSO, 500 MHz)

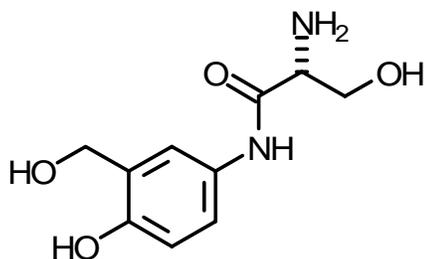
d [ppm] = 1,56 (s, 9H, t.Bu), 3,77 (m, 2H, CH₂OH), 4,28 (m, 1H, CH_α), 4,61 (m, 2H, PhCH₂OH), 5,07 (br, 1H, OH), 5,17 (br, 1H, OH), 9,30 (s, 1H, PhOH), 9,81 (s, 1H, PhNH).

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D₆]-DMSO, 125 MHz)

d [ppm] = 28.19 (3x CH₃), 57.22 (CH), 58.11 (CH₂), 61.97 (CH₂), 78.18 (CH), 114.20 (CH), 118.73 (CH), 119.12 (CH), 128.65 (C), 130.60 (C), 149.99 (C), 155.18 (C), 168.54 (C).

HR-MS (220 °C) berechnet für $C_{15}H_{22}N_2O_6(M^+)$: $m/z = 326.1478$ gefunden $m/z = 326.1492$

N-(2-(*R*)-Amino-3-hydroxypropionyl)-4-amino-2-hydroxymethylphenol



Ansatz:

[2-Hydroxy-1-(<i>R</i>)-(4-hydroxy-3-hydroxymethyl-phenylcarbamoyl)ethyl]-carbamoylsäure-tert.-butylester	1,10 g (2,28 mmol)
5% (v/v) TFA in Dichlormethan	100 ml

Ausbeute: n.b.

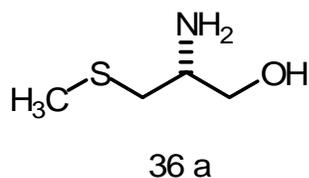
Durchführung:

In 100 ml einer 5 prozentigen (v/v) Lösung von TFA in Dichlormethan werden 1,10 g (2,28 mmol) der Verbindung 34 gelöst. Nach 2 h Rühren ist die Reaktion beendet, und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der so erhaltene Feststoff wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.

HR-MS (130 °C): berechnet für $C_{10}H_{14}N_2O_4(M-TFA)^+$: $m/z = 226,0953$ gef.: $m/z = 226,0959$.

5.1.2.3 Synthese der Ceramid-S-Analoga 37-39

S-Methyl-L-cysteinol 36 a

Ansatz:

Lithiumborhydrid	0,87 g (40,0 mmol)
Trimethylsilylchlorid	10,1 ml (8,64 g, 80,0 mmol)
S-Methylcystein	2,74 g (20,0 mmol)
THF	20 ml

Ausbeute: 1,73 g (14,3 mmol, 72%)

Durchführung:

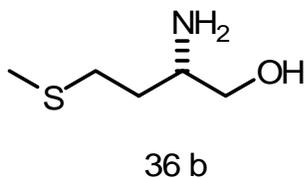
Eine Lösung von 0,87 g (40,0 mmol) Lithiumborhydrid in 20 ml Tetrahydrofuran wird unter Argon Atmosphäre innerhalb von 2 min mit 10,1 ml (8,64 g, 80,0 mmol) Trimethylsilylchlorid versetzt, wobei sich ein Niederschlag von Lithiumchlorid bildet. Zu diesem Gemisch werden unter Rühren innerhalb von 5 min 2,74 g (20,0 mmol) S-Methyl-L-cystein gegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur werden vorsichtig 30 ml Methanol unter Eiskühlung zugetropft und anschließend die flüchtigen Bestandteile abdestilliert. Der Rückstand wird in 15 ml 2 M Natriumhydrogencarbonat Lösung suspendiert, anschließend wird die wäßrige Phase dreimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Man erhält 1,73 g (14,3 mmol, 72%) eines farblosen Öls.

 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz):

d [ppm] = 2,01 (s, 3H, S- CH_3), 2,33 (dd, 1H, $J = 7,6$ Hz und 13,4 Hz, S- CHH), 2,57 (dd, 1H, $J = 5,5$ Hz und 13,4 Hz, S- CHH), 2,87 (m, 1H, CH_α), 3,39 (dd, 1H, $J = 5,9$ Hz und 10,8 Hz, CHHOH), 3,50 (dd, 1H, $J = 4,7$ Hz und 10,8 Hz, CHHOH).

HR-MS (85 °C) berechnet für $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NOS}(\text{M}^+)$: $m/z = 121,0561$ gefunden: $m/z = 121,0554$

L-Methioninol 36 b

Ansatz:

Lithiumborhydrid	0,87 g (40,0 mmol)
Trimethylsilylchlorid	10,1 ml (8,64 g, 80,0 mmol)
L-Methionin	3,02 g (20,0 mmol)
THF	20 ml

Ausbeute: 2,10 g (15,6 mmol, 78%)

Durchführung:

Die Reaktion wurde analog zur Herstellung von 36 a durchgeführt.

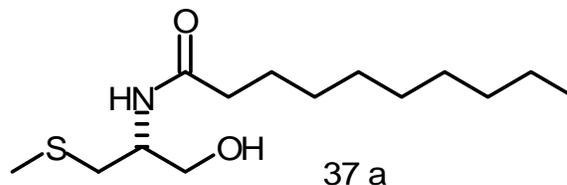
¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz):

d [ppm] = 1,44-1,60 (m, 1H, *CHHCH*₂S) 1,64-1,78 (m, 1H, *CHHCH*₂S), 2,04 (s, 3H, S-CH₃), 2,45-2,64 (m, 1H, *CHHS*), 2,82-2,93 (m, *CHHS*), 2,82-2,92 (m, 1H, CH_α), 3,32 (dd, 1H, $J = 6,8$ Hz und 10,9 Hz, *CHHOH*), 3,49 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz und 10,9 Hz, *CHHOH*).

HR-MS (90 °C) berechnet für C₅H₁₃NOS(M⁺): $m/z = 135,0718$ gefunden: $m/z = 135,0704$

Allgemeine Vorschrift zur Decanoylierung der Aminoalkohole 36 a und 36 b:

Zu einer Suspension von *S*-Methylcysteinol und Natriumcarbonat Wasser werden Dichlormethan und Decanoylchlorid gegeben. Man läßt über Nacht rühren, und trennt dann die Phasen. Danach wird die wäßrige Lösung noch zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Organische Phase wird dann getrocknet, und das Lösungsmittel abgedampft. Anschließend wird der entstandene Feststoff noch in 30 ml einer kochenden 0,5 M Natriumhydrogencarbonat Lösung gerührt. Nach dem Abkühlen filtriert man, und wäscht den Rückstand mit destilliertem Wasser. Man erhält die entsprechenden Amide.

Decansäure (1-(*R*)-hydroxymethyl-2-methylsulfanyl-ethyl)-amid 37 aAnsatz:

<i>S</i> -Methylcysteinol 36 a	600 mg (4,95 mmol)
Decanoylchlorid	1,10 ml (1,03 g, 5,38 mmol)
Natriumcarbonat	520 mg (4,95 mmol)
Wasser	15,0 ml
Dichlormethan	10,0 ml

Ausbeute: 1,13 g (4,10 mmol, 83%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Decanoylierung der Aminoalkohole 36 a und 36 b

R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,77

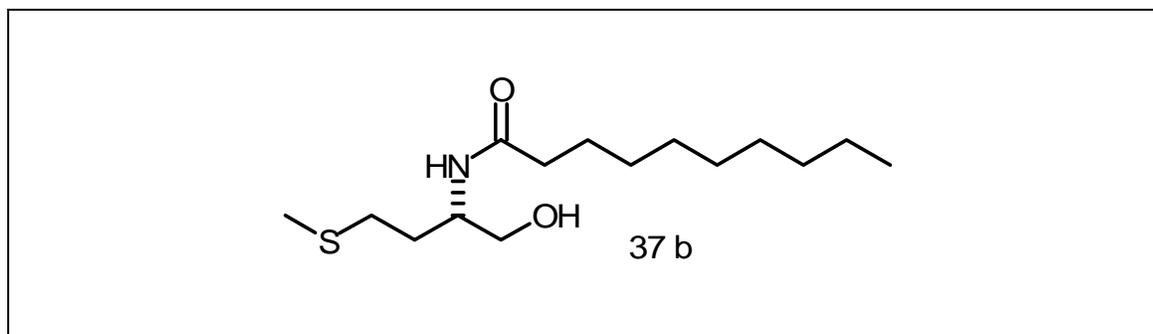
Smp.: 76 °C

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 250 MHz):

d [ppm] = 0,95 (t, 3H, $J = 6,4$ Hz, CH_3), 1,33 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,63 (m, 2H, CH_2), 1,91 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,12 (s, 3H, S-CH_3), 3,26 (dd, 1H, $J = 5,8$ Hz und $10,6$ Hz, CHHOH), 3,50 (dd, 1H, $J = 4,9$ Hz und $10,6$ Hz, CHHOH) 3,81-3,89 (m, 1H, CH_α), 4,83 (br, 1H, OH), 7,76 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, NH).

HR-MS (70 °C) berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_2\text{S}(\text{M}^+)$: $m/z = 275,1919$ gefunden: $m/z = 275,1898$

Decansäure (1-(*R*)-hydroxymethyl-3-methylsulfanyl-propyl)-amid 37 b



Ansatz:

L-Methioninol	1,10 g (8,14 mmol)
Decanoylchlorid	1,80 ml (1,68 g, 8,80 mmol)
Natriumcarbonat	863 mg (8,14 mmol)
Wasser	40 ml
Dichlormethan	20 ml

Ausbeute: 2,08 g (7,16 mmol, 88%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Decanoylierung der Aminoalkohole 36 a und 36 b

R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,81

Smp.: 71° C

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 250 MHz):

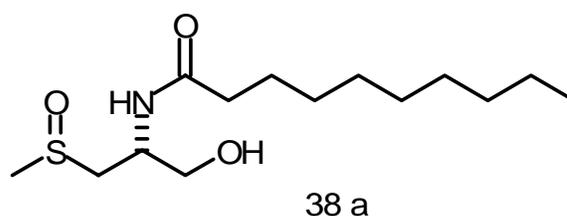
d [ppm] = 0,95 (t, 3H, $J = 6,4$ Hz, CH_3), 1,28-1,41 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,51-1,70 (m, 3H, CH_2, CHH), 1,82-1,96 (m, 1H, CHH), 2,05-2,20 (m, 5H, $\text{SCH}_3, \text{CH}_2$), 2,39-2,56 (m, 2H, CH_2S), 3,33 (dd, 1H, $J = 9,9$ Hz und $16,3$ Hz, CHHOH), 3,42 (m, 2H, CHHOH) 3,79-3,92 (m, 1H, CH_α), 4,83 (m, 1H, OH), 7,67 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, NH). Anm.: das Signal bei 3,42 liegt teilw. unter dem H_2O Signal

EL-MS (125°C): $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{NO}_2\text{S}$ (M^+) ber.: $m/z = 289,2$ gef.: $m/z = 289,2$.

Allgemeine Vorschrift für die Darstellung der Sulfoxide 38 a und 38 b

Das Disulfid wird in einer kalten 7:3 Mischung einer frisch angesetzten 0,5 M Natriumperiodat Lösung (11 Äq.) und Methanol gelöst/suspendiert und über Nacht im Eisbad gerührt. Anschließend extrahiert man zwei- bis dreimal mit Dichlormethan und trocknet die Dichlormethan Phase mit Natriumsulfat und destilliert das Lösungsmittel ab. Anschließend unterwirft man den Rückstand einer säulenchromatographischen Reinigung.

Decansäure (1-(*R*)-hydroxymethyl-2-methylsulfinyl-ethyl)-amid 38 a



Ansatz:

Decansäure (1-(<i>R</i>)-hydroxymethyl-2-methylsulfinyl-ethyl)-amid 37 a	1,10 g (4,00 mmol)
Natriumperiodat	8,41 g (44,0 mmol)
Wasser	88 ml
Methanol	30 ml

Ausbeute: (2,84 mmol, 71%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Sulfoxide 38 a und 38 b

R_f (Dichlormethan/Methanol 12:1) = 0,23

Smp.: 81 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz):

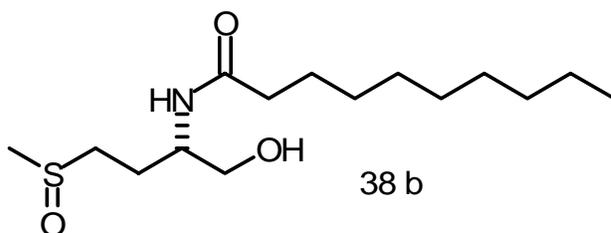
d [ppm] = 0,81 (t, 3H, $J = 6,5$ Hz, CH_3), 1,12-1,28 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,55 (m, 2H, CH_2), 2,15 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,62 (s, 3H, SCH_3), 2,92 (d, 0,6H, $J = 4,2$ Hz,), 3,28 (dd, 0,6H, $J = 5,8$ und $13,4$ Hz,), 3,61-3,88 (m, 2H, CCH_2OH), 4,26 (m, 1H, CH_α), 6,65 (d, 0,6H, $J = 6,71$ Hz, NH). Charakteristische Signale für das Neben-Diastereomer:
2,60 (s, 1H, SCH_3), 2,87 (d, 0,3H, $J = 4,3$ Hz,) 3,13 (dd, 0,3H, $J = 6,7$ Hz u. $13,4$ Hz,), 6,91 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 83 MHz):

d [ppm] = 13.96, 22.50, 25.46, 29.11, (29.17), 29.29, (31.69), 36.35, (36.44), 38.08, 38.92, 48.26, (48.86), 54.60, 57.90, 63.39, 77.10, 173.62, (173.90). (Nebendiastereomer)

HR-MS (110°C) berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_3\text{S}$ (M^+): $m/z = 291,1868$ gef.: $m/z = 291,1886$.

Decansäure (1-(*R*)-hydroxymethyl-3-methylsulfinyl-propyl)-amid 38 b



Ansatz:

Decansäure (1-(<i>R</i>)-hydroxymethyl-3-methylsulfinyl-propyl)-amid 38 b	1,40 g (4,59 mmol)
Natriumperiodat	10,7 g (50,0 mmol)
Wasser	100 ml
Methanol	40 ml

Ausbeute: 1,28 g (4,18 mmol, 91 %)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Sulfoxide 38 a und 38 b

R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,63

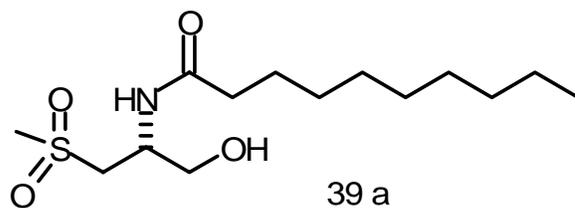
Smp.: 89 °C

EI-MS (125°C): $C_{15}H_{31}NO_3S$ (M^+) ber.: $m/z = 305,1$ gef.: $m/z = 305,1$

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Sulfone 39 a und 39 b

Man löst das Disulfid in wenig Eisessig und fügt 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung hinzu. Man rührt 3 h bei 80 ° C und weitere 14 h bei Raumtemperatur. Anschließend versetzt man die Reaktionslösung mit dem fünffachen Volumen Wasser, worauf das Produkt als farbloser Feststoff ausfällt. Man filtriert ab, wäscht den Filtrückstand mit Wasser und trocknet ihn anschließend im Vakuum. Das so erhaltene farblos-kristalline Produkt ist im DC und NMR-spektroskopisch sauber.

Decansäure (1-(*R*)-hydroxymethyl-2-methylsulfonyl-ethyl)-amid 39 a



Ansatz:

Decansäure (1-(*R*)-hydroxymethyl-2-methylsulfanyl- 825 mg (3,00 mmol)

ethyl)-amid 37 a

30 % H₂O₂ Lösung 1,00 ml

Essigsäure 3 ml

Ausbeute: 848 mg (2,76 mmol, 92%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Sulfone 39 a und 39 b.

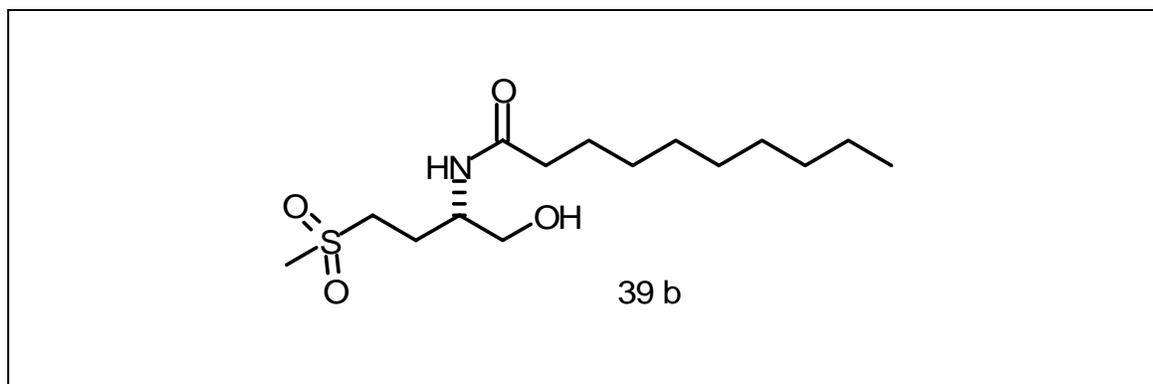
R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,67

Smp.: 112 °C

¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 250 MHz):

d [ppm] = 0,85 (t, 3H, J = 6,4 Hz, CH₃), 1,28-1,34 (m, 12H, 6xCH₂), 2,05-2,15 (m, 2H, CH₂S), 2,30-2,38 (t, 1H, CH₂C=O), 2,94 (s, 3H, SCH₃), 3,70 (m, 2H, CH₂OH), 4,06 (m, 1H, CH_α), 6,20 (d, 1H, J = 8,5 Hz, NH).

Decansäure (1-(*R*)-hydroxymethyl-3-methylsulfonyl-propyl)-amid 39 b

Ansatz:

Decansäure (1-(*R*)-hydroxymethyl-3-methylsulfanyl- 886 mg (3,00 mmol)

propyl)-amid 37 b

30 % H₂O₂ Lösung 1,00 ml

Essigsäure 3 ml

Ausbeute: 921mg (2,87 mmol, 95%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Darstellung der Sulfone 39 a und 39 b.

R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,70

Smp.: 105 °C

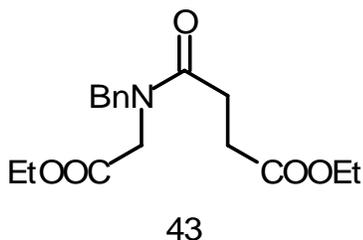
$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz):

d [ppm] = 0,85 (t, 3H, $J = 6,4$ Hz, CH_3), 1,28-1,34 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 2,05-2,15 (m, 2H, CH_2S), 2,30-2,38 (t, 1H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,94 (s, 3H, SCH_3), 3,02-3,12 (m, 1H, CHHS), 3,15-3,23 (m, 1H, CHHS), 3,70 (m, 2H, CH_2OH), 4,06 (m, 1H, CH_α), 6,20 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, NH).

HR-MS (150°C) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{NO}_4\text{S}$ (M^+): $m/z = 321,1973$ gef.: $m/z = 321,1959$.

5.1.2.4 Synthese des Lactams 45

Ethyl *N*-Benzyl-*N*-[(ethoxycarbonyl)methyl]succinamat 43



Ansatz:

<i>N</i> -Benzylglycinethylester	9,49 ml (9,65 g, 50,0 ml)
15% Kaliumcarbonat Lsg.	65 ml
Bernsteinsäureethylesterchlorid	10,27 g (62,5 mmol)
Toluen	180 ml

Ausbeute: 14,1 g (44,0 mmol, 88%)

Durchführung:^[107]

Zu einer Mischung aus 9,65 g (9,49 ml, 50,0 mmol) *N*-Benzylglycineethylester in 90 ml Toluol und 65 ml einer 15-proz. Kaliumcarbonat-Lösung wird über einen Zeitraum von 30 min. eine Lösung von 10,27 g (62,5 mmol) Bernsteinsäureethylesterchlorid in 90 ml trockenem Toluol tropfenweise hinzugegeben. Dabei wird die Reaktionsmischung auf 10 °C gehalten. Nach beendeter Zugabe läßt man die Mischung auf RT aufwärmen und gibt gegebenenfalls noch 15 prozentige Kaliumcarbonat-Lösung hinzu, so daß der pH Wert bei 11 bis 12 liegt. Danach wäscht man jeweils einmal mit je 50 ml 10-proz. Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser. Nachdem man über Natriumsulfat getrocknet hat, wird das Lösungsmittel abdestilliert. Man erhält 14,1 g (44,0 mmol, 88%) eines farblosen Öls.

R_f (Hexan/Essigester 2:1) = 0,24

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

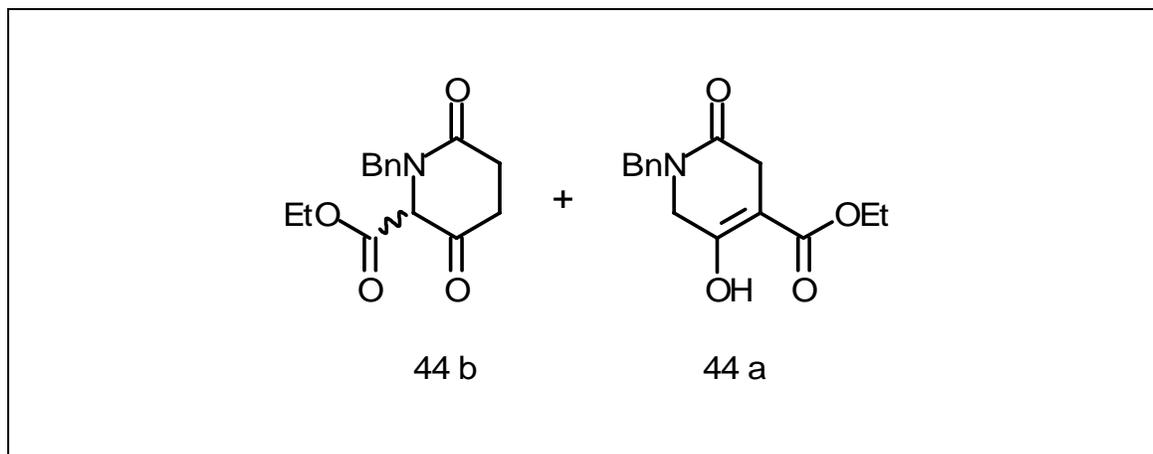
d [ppm] = 1,16 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₃), 1,18 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₃), 2,51-2,74 (m, 4H, CH₂-CH₂), 3,93 (d, 2H, $J = 5,2$ Hz,), 4,07 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH₂CH₃), 4,09 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH₂CH₃), 4,53 (s, 2H, CH₂-C₆H₅), 7,14-7,34 (m, 5H, C₅H₆).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz):

d [ppm] = 14,10 (CH₃), 27,88 (CH₂), 29,24 (CH₂), 47,15 (CH₂), 49,91 (CH₂), 60,56 (CH₂), 126,78 (CH), 127,58 (2xCH), 128,60 (2xCH), 135,85 (C), 169,03 (C), 171,97 (C), 172,86 (C).

HR-MS (75 °C) berechnet für C₁₇H₂₃NO₅(M⁺): $m/z = 321,1576$ gef.: $m/z = 321,1590$

Ethyl 1-Benzyl-3,6-dioxo-piperidin-2-carboxylat 44 b und Ethyl 1-Benzyl-2,5-dioxo-4-piperidincarboxylat 44 a



Ansatz:

Ethyl <i>N</i> -Benzyl- <i>N</i> -[(ethoxycarbonyl)methyl]succinamat 43	7,00 g (22,0 mmol)
50% Kaliumhydrid auf Mineralöl	2,00 g (25,0 mmol)
THF	150 ml

Ausbeute: 44 b/44 a = 4:1, 72% Gesamt-Ausbeute

Durchführung:^[107]

Zu einer Lösung von 2,00 g (25,0 mmol) 50-proz. Kaliumhydrid in 70 ml trockenem THF wird unter Stickstoffatmosphäre tropfenweise über einen Zeitraum von 15 min eine Lösung von 7,00 g (22,0 mmol) des Succinamats 43 in 80 ml trockenem THF hinzugegeben. Nach weiteren 20 min wird die Lösung mit Essigsäure angesäuert, anschließend mit Wasser verdünnt (Vorsicht !), und mit Diethylether extrahiert. Man trocknet die vereinten org. Phasen über Natriumsulfat und destilliert anschließend das Lösungsmittel ab. Nach säulenchromatographischer Trennung erhält man 3,48 g (12,63 mmol) des β -Ketoester 44 b als farbloses Öl und 883 mg (3,21 mmol) des Enols 44 a als gelbes Öl. Die Gesamt-Ausbeute beträgt 72%, das Isomerenverhältnis (44 b/44 a) ist etwa 4:1.

44 b

R_f (Hexan/Essigester 2:1) = 0,13

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

d [ppm] = 1,15 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3), 2,59-2,93 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 4,04 (dd, 2H, $J = 1,2$ Hz und 7,0 Hz, CH_2CH_3), 4,12 (d, 1H, $J = 4,6$ Hz, $\text{CHH-C}_6\text{H}_5$), 4,33 (s, 1H,), 4,98 (d, 1H, $J = 4,6$ Hz, $\text{CHH-C}_6\text{H}_5$), 7,22-7,52 (m, 5H, C_5H_6) ppm.

HR-MS (75 °C) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4(\text{M}^+)$: $m/z = 275,1158$ gef.: $m/z = 275,1147$

44 a

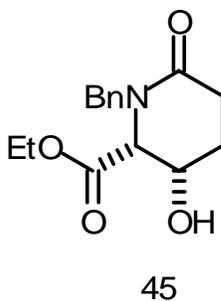
R_f (Hexan/Essigester 2:1) = 0,23

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

d [ppm] = 1,20 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3), 3,16 (t, 2H, $J = 3,2$ Hz,), 3,79 (t, 2H, $J = 3,2$ Hz,), 4,13 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH_2CH_3), 4,53 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 7,14-7,26 (m, 5H, C_5H_6), 11,70 (s, 1H, OH).

HR-MS (75 °C) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_4(\text{M}^+)$: $m/z = 275,1158$ gef.: $m/z = 275,1153$

Ethyl (2*R*, 3*S*)-(-)-3-hydroxy-6-oxo-1-(phenylmethyl)piperidin-2-carboxylat 45



Ansatz:

Ethyl 1-benzyl-3,6-dioxo-4-piperidincarboxylat 44 b 2,25 g (8,17 mmol)

Bäckerhefe 10 g

Leitungswasser 400 ml

Ausbeute: 1,09 g (3,92 mmol, 96%)Durchführung:

In einem 2 l Erlenmeyer Kolben werden 10 g Bäckerhefe in 400 ml ca. 30 °C warmen Wassers 30 Minuten lang leicht geschüttelt, so daß eine homogene Suspension entsteht. Zu dieser Hefe Suspension wird nun eine Lösung von 2,25 g (8,17 mmol) des β -Ketoesters 44 b, in 10 ml Ethanol, gegeben. Dann läßt man 5 Tage in einem warmen Raum schütteln und gibt bei Bedarf etwas Leitungswasser nach. Die Hefe wird nun durch Zentrifugation oder Filtration über Celite abgetrennt. Die wäßrige Lösung wird anschließend mit Natriumchlorid gesättigt, und viermal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Dichlormethan Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird abgedampft. Zuletzt wird der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. Man erhält 1,09 g (3,92 mmol, 96%) farblose Nadeln.

 R_f (Dichlormethan/Methanol 12:1) = 0,46

Smp.: 105 °C Lit.: 106-107 °C

 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 500 MHz):

d [ppm] = 1,26 (t, 3H, $J = 5,9$ Hz, CH₃), 1,99 (m, 2H, 4'-CH₂), 2,47-2,72 (m, 2H, 5'-CH₂), 3,88 (d, 1H, $J = 14,9$ Hz, CHHPh), 4,05-4,19 (m, 4H, 2'-CH, 3'-CH, CH₂CH₃), 5,27 (d, 1H, $J = 14,9$ Hz, CHHPh), 7,12-7,48 (m, 5H, H_{arom.}).

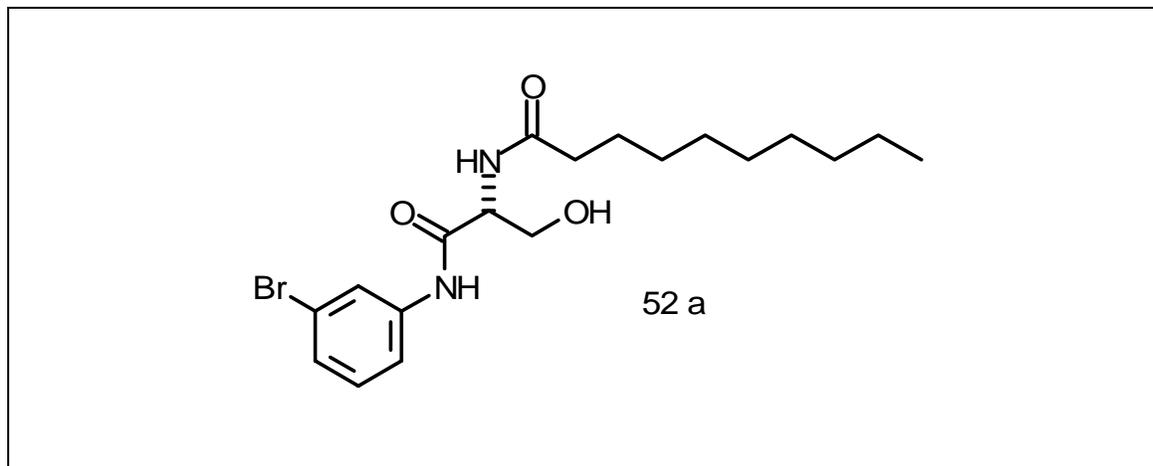
 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 125 MHz)

d [ppm] = 14,18 (CH₃), 26,45 (CH₂), 29,11 (CH₂), 49,55 (CH₂), 61,93 (CH₂), 62,51 (CH), 66,45 (CH), 127,82 (CH), 128,54 (2xCH), 128,69 (2xCH), 136,07 (C), 169,57 (C), 170,09 (C).

HR-MS (80 °C) Berechnet für C₁₅H₁₉NO₄(M⁺): $m/z = 277,1314$ gef.: $m/z = 277,1294$

5.1.2.5 Synthese der Michael-Akzeptoren

Decansäure [1-(3-bromo-phenylcarbamoyl)-2-hydroxy-ethyl]-amid 52 a

Ansatz:

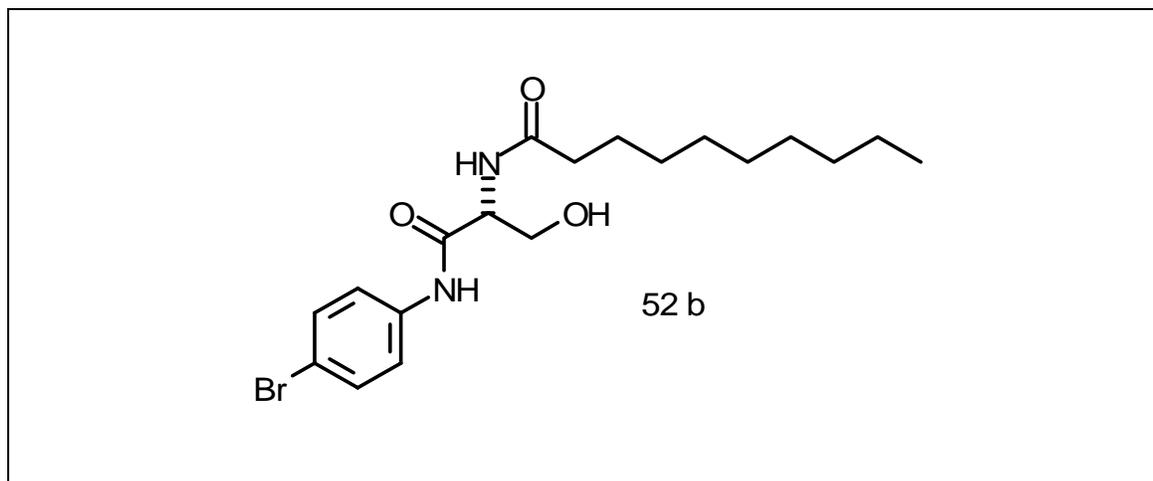
3-Bromanillin	0,33 ml (515 mg, 3,00 mmol)
N-Decanoyl-D-serin 25	777 mg (3,00 mmol)
DCC	680 mg (3,30 mmol)
HOBT	445 mg (3,30 mmol)
DMF	15 ml

Ausbeute: 767 mg (1,86 mmol , 62%)Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Amidkopplung mit DCC/HOBT R_f (Dichlormethan 12:1) = 0,52 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz)

d [ppm] = 0,80 (t, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3), 1,08-1,30 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,59 (m, 2H, CH_2), 2,24 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C=O}$), 3,64 (dd, 1H, $J = 4,9$ Hz und 11,6 Hz, CHHOH), 4,12 (dd, 1H, $J = 3,3$ Hz und 11,6 Hz, CHHOH), 4,58 (m, 1H, CH_α), 6,76 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz, NH), 7,06-7,18 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,35 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,72 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 9,30 (br, 1H, $\text{NH}_{\text{arom.}}$).

HR-MS (80 °C) Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{BrN}_2\text{O}_3(\text{M}^+)$: $m/z = 412,1361$ gef.: $m/z = 412,1347$

Decansäure [1-(4-bromo-phenylcarbamoyl)-2-hydroxy-ethyl]-amid 52 b



Ansatz:

4-Bromanillin	0,33 ml (515 mg, 3,00 mmol)
<i>N</i> -Decanoyl-D-serin 25	777 mg (3,00 mmol)
DCC	680 mg (3,30 mmol)
HOBT	445 mg (3,30 mmol)
DMF	15 ml

Ausbeute: 890 mg (2,16 mmol, 72%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur Amidkopplung mit DCC/HOBT

R_f (Dichlormethan 12:1) = 0,42

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz)

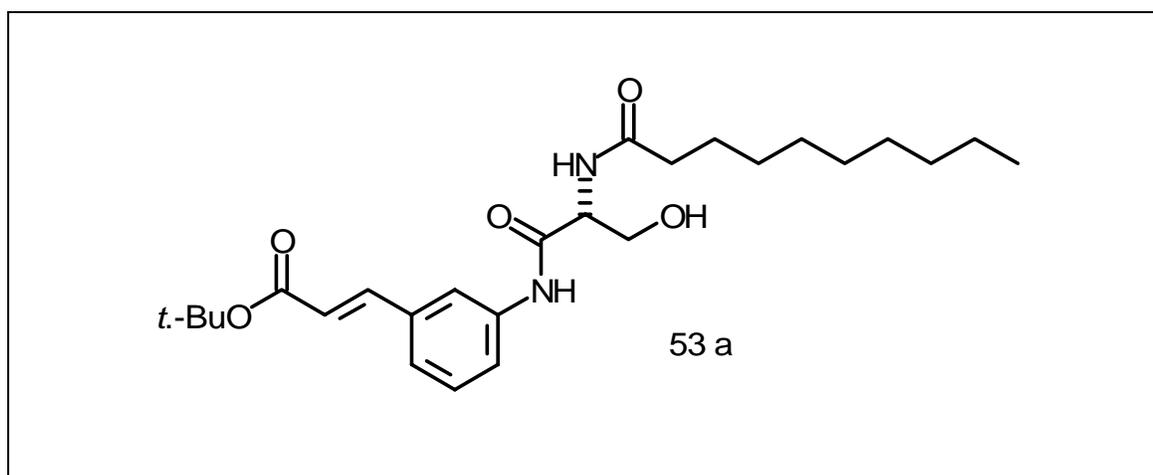
d [ppm] = 0,78 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH_3), 1,18-1,36 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,63 (m, 2H, CH_2), 2,28 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3,64 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz und 10,9 Hz, CHHOH), 4,12 (dd, 1H, $J = 3,6$ Hz und 10,9 Hz, CHHOH), 4,58 (m, 1H, CH_α), 6,76 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz, NH), 7,35 (s, 4H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 9,30 (br, 1H, $\text{NH}_{\text{arom.}}$).

HR-MS (80 °C) Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{BrN}_2\text{O}_3(\text{M}^+)$: $m/z = 412,1361$ gef.: $m/z = 412,1358$

Allgemeine Vorschrift für die Heck-Kupplung von *t*-Butylacrylat mit den Bromverbindungen 52 a und 52 b:

Ein unter Argon gesetztes Pyrex Schraubkappenglas wird mit Acetonitril und Triethylamin versetzt. Darin wird das Bromderivat gelöst, und anschließend mit Palladium-(II)-acetat, Triphenylphosphin und *t*-Butylacrylat versetzt. Danach wird das Glas fest verschlossen, und 24 h im *Reacti-therm* unter Rühren auf 110 °C erhitzt. Anschließend gibt man noch einmal unter Argon zusätzliches Palladiumacetat und Triphenylphosphin. Nach Reaktionsende wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

3-[3-(2-Decanoylamino-3-hydroxy-propionylamino)-phenyl]-acrylsäure-*tert*.-butyl ester 53 a



Ansatz:

Decansäure [1-(3-bromo-phenylcarbamoyl)-2-hydroxy-ethyl]-amid 52 a	330 mg (0,789 mmol)
<i>tert</i> . Butylacrylat	2 x 0,25 ml 2x(208 mg, 1,67 mmol)
Triphenylphosphin	2 x 11 mg 2x(0,042 mmol)
Palladium-(II)-acetat	2 x 2 mg (8,90 µmol)
Triethylamin	1,5 ml
Acetonitril	1,5 ml

Ausbeute: 299 mg (0,65 mmol, 82%)

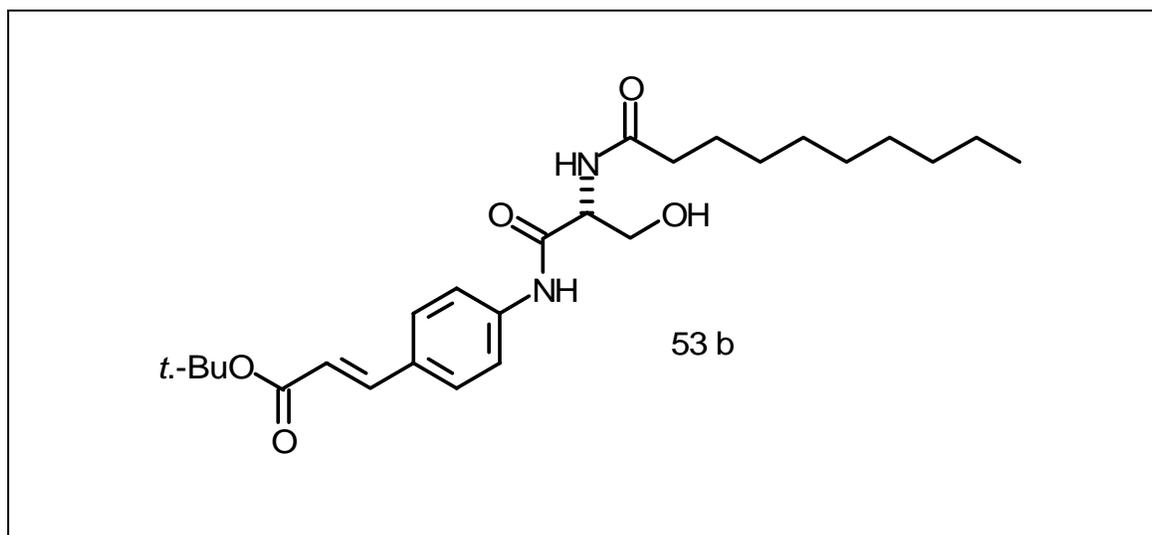
Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift für die Heck-Kupplung von *t.*-Butylacrylat mit den Bromverbindungen 52 a und 52 b.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz)

d [ppm] = 0,80 (t, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3), 1,08-1,30 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$), 1,46 (s, 9H, *t.*-Bu), 1,59 (m, 2H, CH_2), 2,24 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3,64 (dd, 1H, $J = 4,9$ Hz und 11,6 Hz, CHHOH), 4,12 (dd, 1H, $J = 3,3$ Hz und 11,6 Hz, CHHOH), 4,58 (m, 1H, CH_α), 6,76 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz, NH), 6,94 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, $\text{C}=\text{CH}$), 7,06-7,18 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,27 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, $\text{C}=\text{CH}$), 7,35 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,72 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 9,30 (br, 1H, $\text{NH}_{\text{arom.}}$).

HR-MS (70 °C) Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5(\text{M}^+)$: $m/z = 460,2937$ gef.: $m/z = 460,2924$

3-[4-(2-Decanoylamino-3-hydroxy-propionylamino)-phenyl]-acrylsäure-*tert.*-butyl ester 53 b



Ansatz:

Decansäure [1-(4-bromo-phenylcarbamoyl)-2-hydroxy-ethyl]-amid 52 b	330 mg (0,789 mmol)
<i>tert.</i> Butylacrylat	2 x 0,25 ml 2x(208 mg, 1,67 mmol)
Triphenylphosphin	2 x 11 mg 2x(0,042 mmol)
Palladium-(II)-acetat	2 x 2 mg (8,90 μmol)
Triethylamin	1,5 ml
Acetonitril	1,5 ml

Ausbeute: 287 mg (0,62 mmol, 79%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift für die Heck-Kupplung von *t*-Butylacrylat mit den Bromverbindungen 52 a und 52 b.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz)

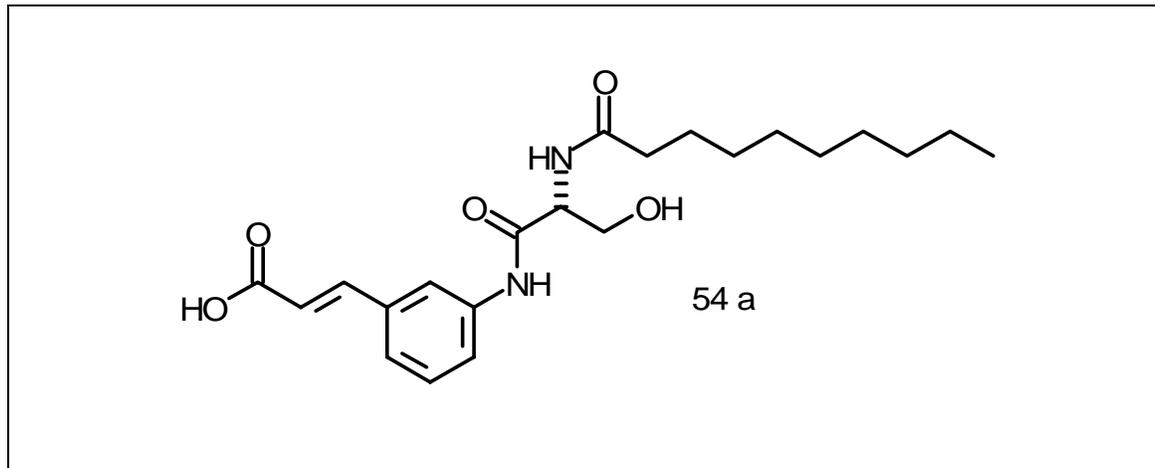
d [ppm] = 0,76 (t, 3H, *J* = 6,7 Hz, CH₃), 1,15-1,28 (m, 12H, 6xCH₂), 1,47 (s, 9H, *t*-Bu), 1,61 (m, 2H, CH₂), 2,29 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, CH₂C=O), 3,61 (dd, 1H, *J* = 4,4 Hz und 11,1 Hz, CHHOH), 4,12 (dd, 1H, *J* = 3,9 Hz und 11,1 Hz, CHHOH), 4,57 (m, 1H, CH_α), 6,81 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, NH), 6,91 (d, 1H, *J* = 16,0 Hz, C=CH), 7,31 (s, 4H, H_{arom.}), 7,48 (d, 1H, *J* = 16,0 Hz, C=CH), 9,30 (br, 1H, NH_{arom.}).

HR-MS (70 °C) Berechnet für C₂₆H₄₀N₂O₅(M⁺): *m/z* = 460,2937 gef.: *m/z* = 460,2921

Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der *t*-Butylester-Gruppe von den Derivaten 53 a, b:

Der *tert*-Butylester wird in 10% (v/v) TFA in Dichlormethan 24 h gerührt. anschließend wird das Lösungsmittel entfernt. Man erhält das entsprechende TFA-Salz als einen Feststoff

3-[3-(2-Decanoylamino-3-hydroxy-propionylamino)-phenyl]-acrylsäure 54 a



Ansatz:

3-[4-(2-Decanoylamino-3-hydroxy-propionylamino)-phenyl]-acrylsäure-*tert.*-butyl ester 53 b 101 mg (0,25 mmol)
 10 % TFA in Dichlormethan 5 ml

Ausbeute: 66 mg (0,16 mmol, 65%)

Durchführung: Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der *tert.*-Butylester-Gruppe von den Derivaten 53 a, b:

¹H-NMR ([D₆]-DMSO, 250 MHz)

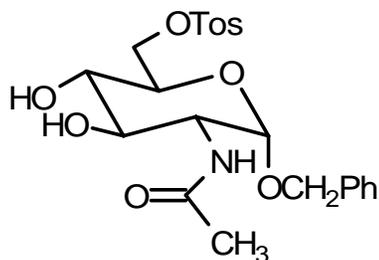
d [ppm] = 0,76 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz, CH₃), 1,17-1,29 (m, 12H, 6xCH₂), 1,61 (m, 2H, CH₂), 2,29 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, CH₂C=O), 3,61 (dd, 1H, *J* = 4,7 Hz und 10,8 Hz, CHHOH), 4,12 (dd, 1H, *J* = 3,9 Hz und 10,8 Hz, CHHOH), 4,57 (m, 1H, CH_α), 6,91 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, C=CH), 7,33 (s, 4H, H_{arom.}), 7,42 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, NH), 7,48 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, C=CH), 9,30 (br, 1H, NH_{arom.}).

EI-MS (85 °C) berechnet für C₂₂H₃₂N₂O₅(M⁺) *m/z* = 404,2 gefunden: *m/z* = 404,2

5.1.2.6 Synthese der 6-Amino-Glc-NAc Derivate 64 a und 64 b

Allgemeine Vorschrift zur regioselektiven Tosylierung der 6'-Position von GlcNac-Derivaten:

Zu einer Lösung des GlcNac-Derivates in trockenem Pyridin wird bei einer Temperatur von 0°C eine Lösung von p-Toluensulfonylchlorid in Dichlormethan unter Rühren hinzugegeben. Man läßt über Nacht rühren, ohne das Eisbad zu erneuern. Anschließend werden die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in wenig Dichlormethan gelöst und mit kalter verdünnter Schwefelsäure, dann mit Natriumhydrogencarbonat Lösung und zuletzt mit Wasser gewaschen. Anschließend trocknet man die Dichlormethan Phase über Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel.

Benzyl 2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-toluen-p-sulfonyl- α -D-glucopyranosid 61 a

61 a

Ansatz:

Benzyl 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-gluco- pyranosid 60 a	10,0 g (32,2 mmol)
p-Toluensulfonylchlorid	10,4 g (54,6 mmol)
Pyridin	50 ml
Dichlormethan	25 ml

Ausbeute: 11,4 g (24,5 mmol, 76%)Durchföhrung: siehe allgemeine Vorschrift zur regioselektiven Tosylierung der 6'-Position von GlcNAc-Derivaten R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,29

Smp.: 66 °C (Lit.: [102] 63-70 °C)

 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz):

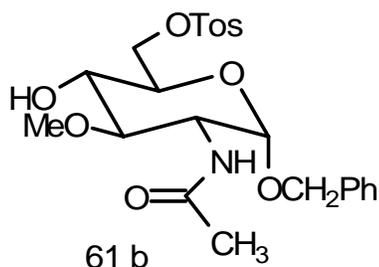
d [ppm] = 1,93 (s, 3H, Ac), 2,43 (s, 3H, PhCH_3), 3,28 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz und 10,3 Hz,), 3,63 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz und 10,8 Hz,), 3,74 (ddd, 1H, $J = 1,8$ Hz 5,7 Hz und 10,3 Hz,), 3,81 (dd, 1H, $J = 3,7$ Hz und 10,6 Hz,), 4,20 (dd, 1H, $J = 5,5$ Hz und 11,0 Hz,), 4,30 (dd, 1H, 2,1 Hz und 11,0 Hz,), 4,40 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, OCHHPh), 4,55 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, OCHHPh), 4,71 (d, 1H, $J =$ Hz, $J = 3,5$ Hz, H-1(α)), 7,26-7,35 (m, 5H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,42 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H_{Tos}), 7,79 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H_{Tos}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz):

d [ppm] = 21,58 (CH_3), 22,49 (CH_3), 55,07 (CH), 70,44 (CH_2), 70,93 (CH_2), 71,48 (CH), 71,89 (CH), 72,50 (CH), 97,49 (CH), 125,54 (CH), 128,90 (CH), 129,09 (CH), 129,32 (CH), 129,40 (CH), 130,98 (CH), 134,47 (C), 138,69 (C), 146,45 (C), 150,04 (CH), 173,52 (C).

FAB-MS berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z = 466,2$ gefunden: $m/z = 466,2$

Benzyl 2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-methyl-6-*O*-toluen-p-sulfonyl- α -D-glucopyranosid 61b



Ansatz:

Benzyl 2-Acetamido-2-desoxy-3- <i>O</i> -methyl- α -D-glucopyranosid 60 b	2,09 g (6,42 mmol)
p-Toluensulfonylchlorid	2,08 g (10,9 mmol)
Pyridin	10 ml
Dichlormethan	5 ml

Ausbeute: 2,41 g (5,02 mmol, 78%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur regioselektiven Tosylierung der 6'-Position von GlcNAc-Derivaten

R_f (Dichlormethan/ Methanol 7:1) = 0,32

Smp.: 61 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) :

d [ppm] = 1,93 (s, 3H, Ac), 2,43 (s, 3H, PhCH_3), 3,28 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz und 10,3 Hz,), 3,63 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz und 10,8 Hz,), 3,74 (ddd, 1H, $J = 1,8$ Hz 5,7 Hz und 10,3 Hz,), 3,81 (dd, 1H, $J = 3,7$ Hz und 10,6 Hz,), 4,20 (dd, 1H, $J = 5,5$ Hz und 11,0 Hz,), 4,30 (dd, 1H, 2,1 Hz und 11,0 Hz,), 4,40 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, OCHHPh), 4,55 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, OCHHPh), 4,71 (d, 1H, $J =$ Hz, $J = 3,5$ Hz, $\text{H-1}(\alpha)$), 7,26-7,35 (m, 5H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,42 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H_{Tos}), 7,79 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H_{Tos}).

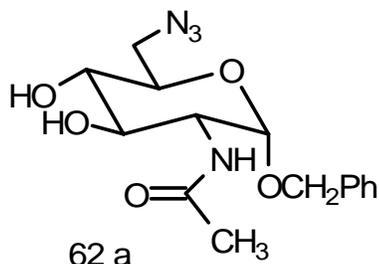
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) :

d [ppm] = 21,58 (CH_3), 22,49 (CH_3), 55,07 (CH), 70,44 (CH_2), 70,93 (CH_2), 71,48 (CH), 71,89 (CH), 72,50 (CH), 97,49 (CH), 125,54 (CH), 128,90 (CH), 129,09 (CH), 129,32 (CH), 129,40 (CH), 130,98 (CH), 134,47 (C), 138,69 (C), 146,45 (C), 150,04 (CH), 173,52 (C).

FAB-MS berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{NO}_8\text{S}$ (M)⁺: $m/z = 478,1$ gefunden: $m/z = 478,2$

Allgemeine Vorschrift für die Herstellung von 6-Azido-GlcNAc Derivaten aus den entsprechenden Tosylaten:

Zu einer Lösung des Tosylats in DMF gibt man vorsichtig Natriumazid und erhitzt dann zwei bis drei Stunden auf 90 °C. Nach Beendigung der Reaktion gießt man die Reaktionsmischung in das 1½-fache Volumen an kaltem Wasser. Es bildet sich ein fester Niederschlag, der abfiltriert und getrocknet wird. Anschließend kristallisiert man aus Ethanol um.

Benzyl 2-acetamido-6-azido-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosid 62aAnsatz:

Benzyl 2-acetamido-2-desoxy-6- <i>O</i> -toluen-p-sulfonyl- α -D-glucopyranosid 61 a	4,65 g (10,0 mmol)
Natriumazid	2,60 g (40,0 mmol)
DMF	30 ml

Ausbeute: 2,91 g (7,98 mmol, 80%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift für die Herstellung von 6-Azido-GlcNAc Derivaten aus den entsprechenden Tosylaten

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0,64

Smp.: 174 °C

$^1\text{H-NMR}$ ([D6]-DMSO, 400 MHz):

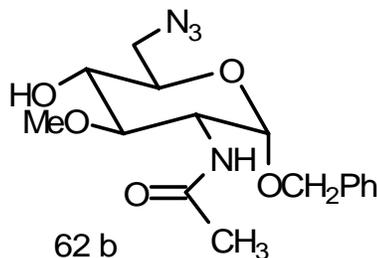
d [ppm] = 1,69 (s, 3H, Ac), 2,90-2,94 (m, 1H, H-4), 3,19-3,32 (m, 3H, H-3 und H-6a,b), 3,61-3,71 (m, 2H, H-2 und H-5), 4,45 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, CHHPh), 4,67 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, CHHPh), 4,74 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-1 α), 4,88 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, OH), 5,31 (d, 1H, $J = 5,8$ Hz, OH), 7,28-7,35 (m, 5H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,86 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D6]-DMSO, 100,6 MHz):

d [ppm] = 22,52 (CH_3), 51,21 (CH), 53,61 (CH_2), 67,45 (CH_2), 70,13 (CH), 71,88 (CH), 71,97 (CH), 96,14 (CH), 127,44 (2xCH), 128,18 (2xCH), 137,54 (C), 169,61 (C).

FAB-MS berechnet für $C_{15}H_{20}N_4O_5$ (M+H)⁺: $m/z = 337,2$ gefunden: $m/z = 337,3$

Benzyl 2-Acetamido-6-azido-2,6-dideoxy-3-O-methyl- α -D-glucopyranosid 62b



Ansatz:

Benzyl 2-acetamido-2-desoxy-3-O-methyl-6-

O-toluen-p-sulfonyl- α -D-glucopyranosid 61b 1,36 g (2,80 mmol)

Natriumazid 0,65 g (10,0 mmol)

DMF 6,5 ml

Ausbeute: 0,76 g (2,17 mmol, 77%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift für die Herstellung von 6-Azido-GlcNAc Derivaten aus den entsprechenden Tosylaten:

R_f (Dichlormethan/Methanol 7:1) = 0,66

Smp.: 153 °C

1H -NMR ([D₆]-DMSO, 500 MHz):

d [ppm] = 1,71 (s, 3H, Ac), 2,92-2,97 (m, 1H, H-4), 3,22-3,36 (m, 3H, H-3 und H-6a,b), 3,28 (s, 3H, OCH₃), 3,64-3,78 (m, 2H, H-2 und H-5), 4,48 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, CHHPh), 4,71 (d, 1H, $J = 11,9$ Hz, CHHPh), 4,74 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-1 α), 4,91 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, OH), 7,19-7,39 (m, 5H, H_{arom.}), 7,89 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, NH).

^{13}C -NMR ([D6]-DMSO, 125 MHz):

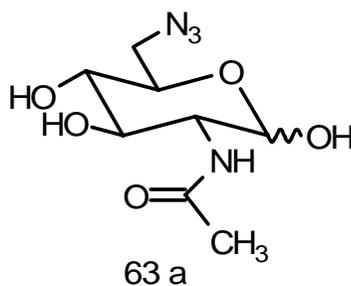
d [ppm] = 22,71 (CH₃), 51,27 (CH), 54,71 (CH₂), 59,71 (CH₃), 68,15 (CH₂), 70,23 (CH), 71,98 (CH), 71,91 (CH), 98,32 (CH), 127,47 (2xCH), 128,56 (2xCH), 137,58 (C), 169,72 (C).

FAB-MS berechnet für C₁₆H₂₂N₄O₅ (M+H)⁺: m/z = 350,2 gefunden: m/z = 350,2

Allgemeine Vorschrift für die Abspaltung von 1-O-Benzylschutzgruppen von GlcNAc-Derivaten:

Das Benzylglykosid wird 6 h in 1 N Salzsäure bei 90 °C gerührt. Anschließend dampft man die Reaktionsmischung bis zur Trockene ein. Man nimmt den Rückstand in etwas Methanol auf und fügt Natriummethanolat und Acetanhydrid hinzu. Nachdem man sich vergewissert hat, daß die Lösung schwach alkalisch ist, läßt man die Reaktionsmischung bei 4°C über Nacht stehen. Danach wird die Lösung eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

N-Acetyl-6-azido-6-desoxy-D-glucosamin 63a



Ansatz:

Benzyl 2-acetamido-6-azido-2,6-dideoxy- α -

D-glucopyranosid 62a 3,20 g (9,50 mmol)

1 N Salzsäure 30 ml

Natriummethanolat 564 mg (10,4 mmol)
 Acetanhydrid 0,90 ml (970 mg, 9,50 mmol)

Ausbeute: 1,49 g (6,08 mmol, 64%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift für die Abspaltung von 1-O-Benzylschutzgruppen von GlcNAc-Derivaten.

Farbloses Öl

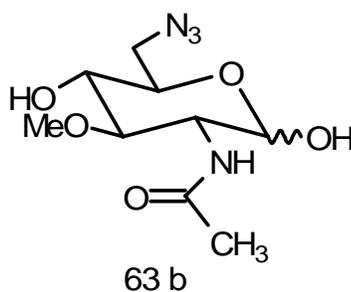
R_f (Dichlormethan/Methanol 5:1) = 0,27 (α) + 0,24 (β)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz):

d [ppm] = 1,95 (s, 3H, Ac), 3,46 (dd, 1H, $J = 8,8$ und $9,6\text{Hz}$, H-4), 3,58 (dd, 1H, $J = 8,8$ und $10,6\text{ Hz}$, H-3), 3,7 (m, 1H, H-5), 3,76-3,87 (m, 2H, H-6a,b), 3,93 (m, 1H, H-2), 4.61 (d, $J = 8,4\text{ Hz}$, H-1(β)), 5.03 (d, $0,8\text{ H}$, $J = 3.45\text{ Hz}$, H-1(α)).

FAB-MS berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$ (M^+): $m/z = 246,1$ gefunden: $m/z = 246,1$

N-Acetyl-6-azido-6-desoxy-3-*O*-methyl-D-glucosamin 63 b



Ansatz:

Benzyl 2-Acetamido-6-azido-2,6-dideoxy-3-*O*-methyl- α -D-glucopyranosid 62b 2,56 g (7,31 mmol)
 1 N Salzsäure 25 ml
 Natriummethanolat 432 mg (8,00 mmol)

Acetanhydrid 0,70 ml (756 mg, 7,40 mmol)

Ausbeute: 1,16 g (4,46 mmol, 61%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift für die Abspaltung von 1-O-Benzylschutzgruppen von GlcNAc-Derivaten.

R_f (Dichlormethan/Methanol 5:1) = 0,34 (α) und 0,31 (β)

Farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 250 MHz):

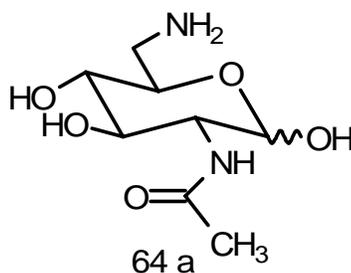
d [ppm] = 1,74 (s, 3H, Ac), 2,88-2,91 (m, 1H, H-4), 3,22-3,36 (m, 3H, H-3 und H-6a,b), 3,28 (s, 3H, OCH_3), 3,64-3,78 (m, 2H, H-2 und H-5), 4,58 (d, 0,3H, $J = 7,9$ Hz, H-1 β), 4,74 (d, 0,7H, $J = 3,5$ Hz, H-1 α).

FAB-MS berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$): $m/z = 260,1$ gefunden: $m/z = 260,2$

Allgemeine Vorschrift zur hydrogenolytischen Reduktion der Azido-Zucker 63 a und 63 b:

Das Azid wird in Methanol gelöst. Darauf hin wird unter Schutzgas eine Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle zugegeben und die Apparatur durch mehrmaliges entgasen und beschicken mit Wasserstoff gesättigt. Man läßt zwei Stunden rühren und filtriert, nachdem man sich vergewissert hat, daß kein Edukt mehr vorhanden ist, den Katalysator über Celite ab und entfernt das Lösungsmittel.

2-Acetamido-6-amino-2,6-dideoxy-3-O-methyl-D-glucose 64 a



Ansatz:

N-Acetyl-6-azido-6-desoxy-D-glucosamin 63 a 900 mg (3,65 mmol)

Methanol 45 ml

Ausbeute: 683 mg (3,10 mmol, 85%)

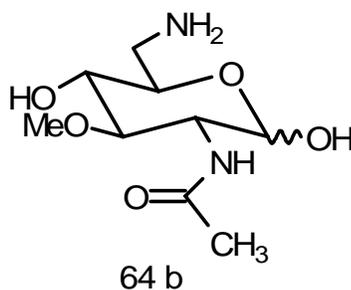
Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur hydrogenolytischen Reduktion der Azido-Zucker 63 a und 63 b.

Farbloses Öl, läuft nicht im DC.

¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz):

d [ppm] = 1,95 (s, 3H, NHCH₃), 2,74 (m, 1H, H_{ring}), 3,67 (m, 2H, H-6_{a,b}), 3,98 (m, 1H, H_{ring}), 4,38 (m, 1H, H_{ring}), 4,44 (m, 1H, H_{ring}), 4,58 (br, 1H, 0,36H, H-1β), 4,67 (br, 0,64H, H-1α).

2-Acetamido-6-amino-2,6-dideoxy-3-*O*-methyl-D-glucose 64 b

Ansatz:

N-Acetyl-6-azido-6-desoxy-3-*O*-methyl-D- 600 mg (2,31 mmol)

glucosamin 63 b

Methanol 30 ml

Ausbeute: 490 mg (2,09 mmol, 90%)

Durchführung: siehe allgemeine Vorschrift zur hydrogenolytischen Reduktion der Azido-Zucker 63 a und 63 b.

Gelbes Öl, läuft nicht im DC

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz):

d [ppm] = 1,97 (s, 3H, NHCH_3), 2,73 (m, 1H, H_{ring}), 3,44 (s, 3H, OCH_3), 3,65 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{a,b}}$), 3,89 (m, 1H, H_{ring}), 4,32-4,35 (m, 1H, H_{ring}), 4,42 (m, 1H, H_{ring}), 4,55 (br, 1H, 0,5H, $\text{H-1}\beta$), 4,59 (br, 0,5H, $\text{H-1}\alpha$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz):

d [ppm] = 22,47 (CH_3), 23,21 (CH_3), 45,29 (CH_2), 45,57 (CH_2), 58,89 (CH_3), 59,25 (CH_3), 59,27 (CH), 60,18 (CH), 64,58 (CH), 65,01 (CH), 77,80 (CH), 80,47 (CH), 87,03 (CH), 89,17 (CH), 90,74 (CH), 93,20 (CH), 172,24 (C).

FAB-MS berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z = 235,1$ gefunden: $m/z = 235,1$

5.2 Biochemische Arbeiten

5.2.1 Allgemeine Angaben

Kühlung

Alle Prozeduren wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C bzw. unter Eiskühlung durchgeführt. Die benötigten Geräte (Zentrifugenbecher, Homogenisator usw.) wurden über Nacht im Kühlschrank vorgekühlt. Die Ultrazentrifuge wird ca. 1 h vor dem Lauf (ohne Rotor) auf 4 °C gekühlt.

Puffer

Die Grundpuffer wurden alle am Vortag angesetzt, die Protease Inhibitoren (inkl. PMSF) und die reduzierenden Agenzien (DTT und β -Mercaptoethanol) wurden unmittelbar vor Gebrauch zugegeben. Da PMSF nur schlecht in Wasser löslich ist, wurde eine konzentrierte Lösung in Isopropanol angesetzt (im Kühlschrank Monatelang haltbar). Diese Lösung wird unter Rühren langsam zu dem Puffer zugetropft. Alle Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert.

Konkrete Angaben über Löslichkeiten und Haltbarkeit von Stammlösungen sind auch in dem Buch *Protein Methods* zu finden.^[108]

Ratten

Die Ratten wurden jeweils zum Tag vor der Präparation bestellt, und an einem ruhigen Ort aufbewahrt. Sie wurden über Nacht nur mit Wasser versorgt.

Ultrazentrifugation

Für die Ultrazentrifugation wurde in Bonn ein Festwinkel Rotor 45 Ti (Beckman) benutzt. In Karlsruhe wurde ein Schwenkbecher Rotor SW 50 Ti (Beckman) benutzt.

Daten: Radius (min.): 34,4 mm Radius (max.): 80,8 mm Max. Rotor speed: 50000 rpm.

Die Rotor-Daten sowie ein Kalkulationsprogramm für die Umrechnung von *rpm* in *g* und umgekehrt können online abgerufen werden, unter

<http://www.beckmancoulter.com/beckman/biosrch/prodinfo/cntrifug/rotcalc.asp>

Anionenaustauscher Säule Poros 20 HQ

Die Poros 20 HQ Anionenaustauscher-Säule wurde vor jeder SMase-Präparation nach Herstellerangaben (1. Spülen mit 1M NaOH/1M NaCl 2. Spülen mit 1 M HCl 3. Spülen mit H₂O bidest., alles in umgekehrter Laufrichtung) regeneriert.

Radioaktivität

Alle Schritte, an denen Radioaktive Substanzen beteiligt waren, wurden auf abgeklebten Flächen in den dafür vorgesehenen Labors gemäß den entsprechenden Betriebsanweisungen durchgeführt.

5.2.2 Geräte und Materialien

CD-Ratten, männlich, 226-250 g (im Normalkarton)	<i>Charles River, Sulzfeld</i>
[Cholin-Methyl] ¹⁴ C-Sphingomyelin	<i>ICN Biomedicals, Eschwege / Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Sphingomyelin, Rinderhirn	<i>Sigma, Taufkirchen</i>
Leupeptin, Antipain, Chymostatin, Pepstatin A	<i>Sigma, Taufkirchen</i>
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	<i>ICN Biomedicals, Eschwege</i>
Poros 20 HQ	<i>PerSeptive Biosystems Inc., Wiesbaden</i>
PEEK Plastiksäule 4,6 mm x 50 mm (0,76 ml)	<i>PerSeptive Biosystems Inc., Wiesbaden</i>
Luma Safe plus, Szintillations-Cocktail für wässrige (!) Lösungen	<i>Lumac LSC, Groningen, NL</i>
Manumycin A	<i>Alexis Corp., Grünberg</i>

Biocad Sprint FLA 500	<i>PerSeptive Biosystems Inc., Wiesbaden</i>
Ultraschall Desintegrator „Sonifier 250“	<i>Branson Ultraschall, Dietzenbach</i>
Cup Horn Becher-Resonator	<i>Branson Ultraschall, Dietzenbach</i>
Ultrazentrifuge	<i>Beckman Coulter</i>
Teflon Homogenisator	<i>Potter, UK</i>
Vortex Minishaker MS1	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>

Schüttelinkubator	<i>GFL</i> , Vertrieb: LHG
HI 9321 Mikroprozessor pH-Meter	<i>Hanna Instruments</i> ,
Tischzentrifuge 5415c	<i>Eppendorf</i> ,
Kühlzentrifuge 5417R	<i>Eppendorf</i> ,
Mikroplatten Spektrometer Optimax	<i>Molecular Devices</i> , Ismaning
Szintillationszähler Tri-Carb 2100 TR	<i>Packard</i> ,

5.2.3 Präparation von Mikrosomen mit N-SMase und A-SMase Aktivität aus Rattenhirn

5.2.3.1 Puffer und Lösungen

1. Homogenisat Puffer	50 mM TRIS/HCl pH 7,4 20 mg/l Leupeptin, Chymostatin, Pepstatin A, Antipain 1 mM PMSF, 2mM EDTA, 5mM EGTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriummolybdat, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 5 mM β -Mercaptoethanol
2. Solubilisierungs Puffer	Homogenisat-Puffer + 1% (v/v) Triton X-100
3. Äquilibrierungs Puffer	20 mM TRIS/HCl pH 7,4 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA
4. Auswasch Puffer	Wie Äquilibrierungs Puffer, enthält zusätzlich 1 M Natriumchlorid
5. Elutions Puffer	Wie Äquilibrierungs Puffer, enthält zusätzlich 1% (v/v) Triton X-100

5.2.3.2 Präparation und Homogenisation von Rattenhirnen

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Präparation von 4 Rattenhirnen. Es wurden aber auch nur ein oder zwei Rattenhirne präpariert. Die Mengenangaben verringern sich entsprechend.

Die partielle Reinigung der Sphingomyelinasen erfolgte in Abwandlung einer von Hannun et al. beschriebenen Methode.^[12] Dazu wurden 4 Ratten decapitiert und die Gehirne entfernt. Nach der Decapitierung wird mit einer Schere das Fell vom Schädel entfernt. Dann wird mit einer starken Schere der Schädel vom Rückenmark bis etwa zum Auge auf beiden Seiten

gespalten. Das Hirn wird mit einer Pinzette entfernt und eventuell mit etwas Kochsalz-Lösung von Blut gereinigt und auf 50 ml eisgekühlten Homogenisat Puffer (s.o.) gelegt.

Anschließend werden die Gehirne mit einem Teflon Homogenisator im Homogenisat Puffer (50 ml) bei ca. 1500 U/min 5-10 Minuten lang homogenisiert (Schaumbildung möglichst vermeiden).

5.2.3.3 Aufarbeitung des Rattenhirn Roh-Homogenats

Methode A:

Das Roh-Homogenat wird bei 100.000 g zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Der feste Rückstand („*Pellet*“) wird mit einer Pasteurpipette (Plastik) in 5-10 ml Solubilisierungs Puffer (mit 1% Triton x-100, s.o.) vorsichtig solubilisiert und 15 min auf Eis stehen gelassen. Dann wird zur Abtrennung grober Partikel 15 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Lösung wird anschließend mit Homogenisat Puffer auf das zwanzigfache Volumen verdünnt und durch einen Sterilfilter auf eine Anionenaustauscher-Säule (POROS 20 HQ) gegeben.

Methode B:

Das Roh-Homogenat wird 15 min bei 1000 g zentrifugiert, um die größten Partikel abzutrennen. Der Überstand wird abgetrennt und das *Pellet* wird in 2 Volumenanteilen des Homogenat Puffers erneut homogenisiert, und bei 1000 g zentrifugiert. Die Vereinigten Überstände werden dann 90 min bei 105.000 g zentrifugiert. Das *Pellet* wird in wenig Solubilisierungs Puffer solubilisiert und 15 min auf Eis stehen gelassen. Dann verdünnt man die Lösung mit Homogenisat Puffer auf das zwanzigfache Volumen und gibt sie durch einen Sterilfilter auf eine Anionenaustauscher-Säule (POROS 20 HQ).

Die *Methode B* wurde erst einmal durchgeführt, sie birgt aber den Vorteil, daß nach vorheriger Abtrennung grösster Partikel durch Zentrifugation bei 1000 g die SMase enthaltende Fraktion recht klein ist und in wenig Solubilisierungs Puffer aufgenommen werden kann. Man erhält so konzentriertere Lösungen, die nachher nach Bedarf verdünnt werden können.

5.2.3.4 Chromatographischer Reinigungsschritt

Der Auftrag und die Elution der Säule läuft voll automatisiert ab. Im Anhang ist ein Programm für den chromatographischen Reinigungsschritt beigefügt. Der prinzipielle Ablauf ist wie folgt:

Zuerst wird die Säule mit 5 Säulenvolumina ($CV = column\ volume(s)$) des Äquilibrierungs Puffers äquilibriert. Dann wird die verdünnte Mikrosomen Fraktion am besten über einen Schlauch mit der Pumpe der Biocad Anlage aufgetragen. Danach wird mit 10 CV Äquilibrierungs Puffer und dann mit 5 CV Auswasch Puffer gewaschen. Schließlich wird mit einem Gradienten von 0-1% (v/v) Triton X-100 (Gradient von 0-100% Elutionspuffer in Äquilibrierungs Puffer) über 10 Säulenvolumina die N-SMase und die A-SMase eluiert. Die Elutionspuffer sollten keine Thiole wie DTT und β -Mercaptoethanol enthalten, da diese Manumycin A und die entsprechenden Analoga inaktivieren. Möglicherweise erfolgt eine nukleophile Öffnung des Oxiran-Ringes, zumal diese Reagenzien in Bezug auf die Inhibitoren in etwa hundertfachem Überschuß vorliegen.

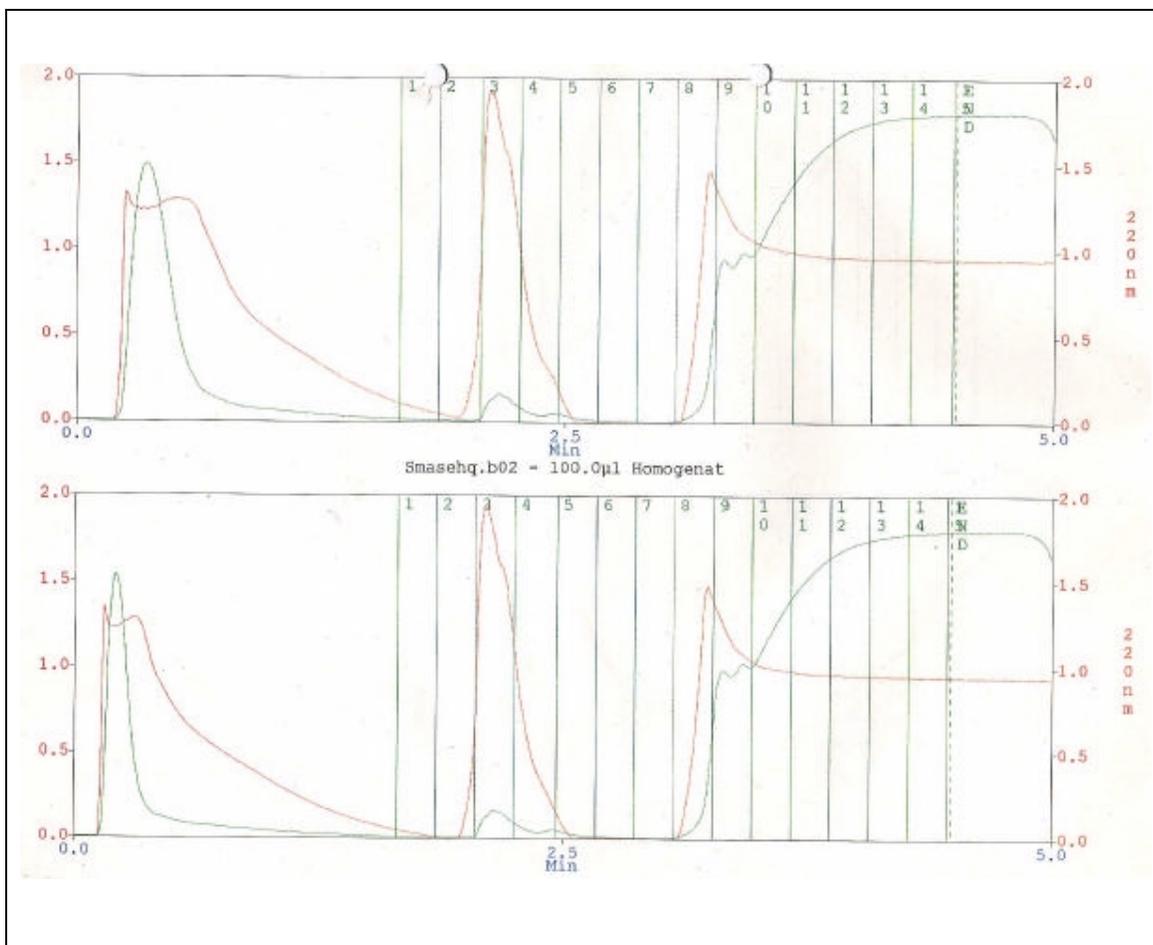


Abb. 31: Typische Elutionsprofile für die Reinigung der Rattenhirn Mikrosomen an Poros 20 HQ

In Abb. 31 sind zwei typische Elutionsprofile gezeigt. Die Fraktionssammlung beginnt zeitgleich mit dem Auswasch Puffer. Die N-SMase und A-SMase Aktivität ist normalerweise auf die Fraktionen 8 und 9, und etwas weniger auf die Fraktionen 10 und 11 verteilt. Der Anstieg der Extinktion ab Fraktion 8 ist nicht nur auf die eluierten Enzyme, sondern auch auf die Absorption durch Triton X-100 zurückzuführen. Deshalb sollte in jedem Fall unabhängig von der Extinktion eine Aktivitätsbestimmung mit den einzelnen Fraktionen durchgeführt werden. Die SMase haltigen Fraktionen werden in Eppendorfgeläße in Portionen von beispielsweise 200 µl aufgeteilt, am besten in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei – 80 °C gelagert.

5.2.4 Der Sphingomyelinase Assay

5.2.4.1 Puffer und Lösungen

1. ¹⁴ C-Sphingomyelin-Stammlösung (wie geliefert)	10 µCi in 100 µl Methanol/Toluen 1:1 Spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol
2. Sphingomyelin Stammlösung	10 mM Sphingomyelin in Ethanol (75 mg Sphingomyelin auf 10 ml)
3. N-SMase Assay-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,05% (v/v) Triton X-100, 5 mM MgCl ₂
4. A-SMase Assay-Puffer	100 mM Natriumacetat / Essigsäure, pH 5.0
5. ¹⁴ C-Sphingomyelin Puffer	200 µM ¹⁴ C-Sphingomyelin (ca. 40.000 cpm) in N-SMase oder A-SMase Assay Puffer

Zur Herstellung des ¹⁴C-Sphingomyelin Puffers werden 25 µl der ¹⁴C-Sphingomyelin Stammlösung und 45 µl der Sphingomyelin Stammlösung in ein Schraubkappen Gefäß pipettiert. Dann wird das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgedampft (Abzug !). Nachdem man sich vergewissert hat, daß die Substanzen vollständig trocken sind, werden 2,5 ml des gewünschten Assay Puffers hinzugegeben. Das geschlossene Schraubkappen Gefäß wird zuerst mehrmals geschüttelt (Vortex) und anschließend fünf Minuten mit dem Ultraschallgerät beschallt (power 100%, duty cycle 50%). Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis sich das Sphingomyelin vollständig gelöst hat.

Puffer, der längere Zeit nicht mehr benutzt wurde, wird vor Benutzung ein bis zweimal beschallt.

5.2.4.2 Die Assay Durchführung

Zur Messung der N-SMase Aktivität werden die entsprechenden Inhibitoren in Chloroform gelöst, ein Aliquot von 10 nmol im Stickstoffstrom in dem Reaktionsgefäß eingedampft, und in 40 µl N-SMase oder A-SMase Puffer aufgenommen und mit 10 µl der Enzym Lösung versetzt. Diese Proben werden parallel zu den entsprechenden Kontrollen, die keinen Inhibitor enthalten 90, 60, 45, 30 und 15 Minuten bei 37° C vorinkubiert. Nach Zusatz von 50 µl (10 nmol) ¹⁴C-Sphingomyelin Puffer (ca. 40000 cpm) in wird noch eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 800 µl Chloroform/Methanol v/v 1:1 gestoppt. Nach Zugabe von 200 µl Wasser wird jeweils 30 Sekunden auf der höchsten Geschwindigkeit (Vortex) ausgeschüttelt. Zur Trennung der Phasen wird fünf Minuten bei 12.000 Upm zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge) und dann mit der Pipette ein Aliquot (200 µl oder 300 µl) der polaren Oberphase, die das ¹⁴C-Phosphorylcholin enthält, entnommen. Die Aliquots werden mit 10 ml Szintillations-Cocktail vermischt und im Szintillationszähler ausgewertet.

6 Literatur

- [1] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* 1999, *111*, 1632-1670; *Angew. Chem., Int. Ed.* 1999, *38*, 1532-1568.
- [2] Y. Hannun, R. Bell, *Science* 1989, *243*, 500-507.
- [3] Y. A. Hannun, in Y. A. Hannun (Ed.): *Sphingolipid-Mediated Signal Transduction*, Springer, New York 1997, p. 1-18.
- [4] D. K. Perry, Y. A. Hannun, *Biochim. Biophys. Acta* 1998, *1436*, 233-243.
- [5] A. Huwiler, T. Kolter, J. Pfeilschifter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* 2000, *1485*, 63-99.
- [6] K. Hofmann, V. M. Dixit, *Trends Biochem. Sci.* 1998, *23*, 374-377.
- [7] K. Hofmann, V. M. Dixit, *Trends Biochem. Sci.* 1999, *24*, 227.
- [8] R. Kolesnick, Y. A. Hannun, *Trends Biochem. Sci.* 1999, *24*, 224-225.
- [9] D. K. Perry, Y. A. Hannun, *Trends Biochem. Sci.* 1999, *24*, 226-227.
- [10] J. D. Watts, R. Aebersold, A. J. Polverino, S. D. Patterson, M. Gu, *Trends Biochem. Sci.* 1999, *24*, 228.
- [11] R. Testi, *Trends Biochem. Sci.* 1996, *21*, 468-471.
- [12] B. Liu, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* 1997, *272*, 16281-16287.
- [13] B. Liu, N. Andrieu-Abadie, T. Levade, P. Zhang, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* 1998, *273*, 11313-11320.
- [14] S. Jayadev, C. M. Linardic, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* 1994, *269*, 5757-5763.
- [15] M. Tanaka, F. Nara, K. Suzuki-Konagai, T. Hosoya, T. Ogita, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, *119*, 7871-7872.
- [16] F. Nara, M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, *J. Antibiot.* 1999, *52*, 525-530.
- [17] C. Arenz, A. Giannis, *Angew. Chem.* 2000, *112*, 1498-1500; *Angew. Chem., Int. Ed.* 2000, *39*, 1440-1442.
- [18] C. Arenz, M. Thutewohl, O. Block, H.-J. Altenbach, H. Waldmann, A. Giannis, *Chem. Biochem.* , *im Druck*.
- [19] J. L. W. Tudichum, *The Chemical Constitution of the Brain*, Balliere, Tindall & Cox, London 1884.
- [20] T. Yamashita, R. Wada, T. Sasaki, C. Deng, U. Bierfreund, K. Sandhoff, R. L. Proia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, *96*, 9142-9147.
- [21] D. T. Downing, *J. Lipid Res.* 1992, *33*, 302-313.

- [22] T. Doering, R. L. Proia, K. Sandhoff, *FEBS Lett.* 1999, 447, 167-170.
- [23] T. Kolter, K. Sandhoff, *Chem. Soc. Rev.* 1996, 25, 371-381.
- [24] Y. Miyake, Y. Kozutsumi, S. Nakamura, T. Fujita, T. Kawasaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 211, 396-403.
- [25] S. A. Lauer, N. Ghori, K. Haldar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 9181-9185.
- [26] Y. Liu, R. Wada, H. Kawai, K. Sango, C. Deng, T. Tai, M. P. McDonald, K. Araujo, J. N. Crawley, U. Bierfreund, K. Sandhoff, K. Suzuki, R. L. Proia, *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 497-505.
- [27] W. Fürst, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1126, 1-16.
- [28] K. Sandhoff, K. Harzer, W. Fürst, in C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle (Eds.): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Mc Graw Hill, New York 1995, p. 2427-2441.
- [29] T. Kolter, K. Sandhoff, *Brain Pathol.* 1998, 8, 79-100.
- [30] G. Brenner-Weiss, A. Giannis, K. Sandhoff, *Tetrahedron* 1992, 48, 5855-5860.
- [31] G. van Echten-Deckert, A. Giannis, A. Schwarz, A. H. Futerman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 1184-1191.
- [32] C. Arenz, A. Giannis, in U. Diederichsen (Hrsg.): *"Bioorganic Chemistry - Highlights and new Aspects"*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, 225-231.
- [33] Y. A. Hannun, R. M. Bell, *Science* 1987, 235, 670-674.
- [34] M.-J. Lee, J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel, T. Hla, *Science* 1998, 279, 1552-1555.
- [35] T. Okazaki, R. M. Bell, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 19076-19080.
- [36] P. Krauss, *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, Wiley-VCH, Weinheim 1997.
- [37] T. A. Chan, P. J. Morin, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 681-686.
- [38] T. A. Chan, P. J. Morin, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Can 130:119581*, (The Johns Hopkins University, USA), Wo, 38 pp.
- [39] A. Giannis, *Angew. Chem.* 2000, 112, 2349-2351; *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, 39, 2261-2263.
- [40] S. M. Prescott, F. A. Fitzpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1470, M69-M78.
- [41] I. Galve-Roperh, C. Sánchez, M. L. Cortéz, T. Gómez Del Pulgar, M. Izquierdo, M. Guzmán, *Nature Med.* 2000, 6, 313-319.

- [42] D. K. Perry, J. Carton, A. K. Shah, F. Meredith, D. J. Uhlinger, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 9078-9084.
- [43] L. E. Quintern, G. Weitz, H. Nehrkorn, J. M. Tager, A. W. Schram, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* 1987, 922, 323-336.
- [44] T. Yamanaka, K. Suzuki, *J. Neurochem.* 1982, 38, 1753-1764.
- [45] N. Sakuragawa, *J. Biochem.* 1982, 92, 637-646.
- [46] L. E. Quintern, E. H. Schuchman, O. Levran, M. Suchi, K. Ferlinz, H. Reinke, K. Sandhoff, R. J. Desnick, *Embo J.* 1989, 8, 2469-2473.
- [47] E. H. Schuchman, M. Suchi, T. Takahashi, K. Sandhoff, R. J. Desnick, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 8531-8539.
- [48] D. Newrzella, W. Stoffel, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1992, 373, 1233-1238.
- [49] R. Schwandner, K. Wiegmann, K. Bernardo, D. Kreder, M. Krönke, *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 5916-5922.
- [50] T. Machleidt, K. Wiegmann, T. Henkel, S. Schutze, P. Baeuerle, M. Krönke, *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 13760-13765.
- [51] P. Santana, L. A. Pena, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E. H. Schuchman, Z. Fuks, R. Kolesnick, *Cell* 1996, 86, 189-199.
- [52] J. P. Jaffrezou, J. M. Herbert, T. Levade, M. N. Gau, P. Chatelain, G. Laurent, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 19858-19864.
- [53] L. Di Marzio, E. Alesse, P. Roncaioli, P. Muzi, S. Moretti, S. Marcellini, G. Amicosante, C. De Simone, M. G. Cifone, *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1997, 109, 154-163.
- [54] N. Andrieu-Abadie, J. P. Jaffrezou, S. Hatem, G. Laurent, T. Levade, J. J. Mercaider, *Faseb J.* 1999, 13, 1501-1510.
- [55] N. Ghosh, R. Sabbadini, S. Chatterjee, *Mol. Cell Biochem.* 1998, 189, 161-168.
- [56] B. Liu, D. F. Hassler, G. K. Smith, K. Weaver, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 34472-34479.
- [57] K. Bernardo, O. Krut, K. Wiegmann, D. Kreder, M. Micheli, R. Schafer, A. Sickman, W. E. Schmidt, J. M. Schroder, H. E. Meyer, K. Sandhoff, M. Krönke, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 7641-7647.
- [58] S. Chatterjee, H. Han, S. Rollins, T. Cleveland, *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 37407-37412.
- [59] S. Tomiuk, K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, W. Stoffel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 3638-3643.

- [60] S. Tomiuk, M. Zumbansen, W. Stoffel, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 5710-5717.
- [61] H. Sawai, N. Domae, N. Nagan, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 38131-38139.
- [62] Y. Neuberger, H. Shogomori, Z. Levy, M. Fainzilber, A. H. Futerman, *FEBS Lett.* 2000, 469, 44-46.
- [63] D. Adam, S. Adam-Klages, M. Krönke, *J. Inflamm.* 1995, 47, 61-66.
- [64] B. Segui, N. Andrieu-Abadie, S. Adam-Klages, O. Meilhac, D. Kreder, V. Garcia, A. P. Bruno, J.-P. Jaffrezou, R. Salvayre, M. Kronke, T. Levade, *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 37251-37258.
- [65] R. Pellkofer, K. Sandhoff, *J. Neurochem.* 1980, 34, 988-992.
- [66] M. D. Lister, C. L. Crawford-Redick, C. R. Loomis, *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1165, 314-320.
- [67] M. D. Lister, Z. S. Ruan, R. Bittman, *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1256, 25-30.
- [68] T. R. Hoye, M. A. Tennakoon, *Org. Lett.* 2000, 2, 1481-1483.
- [69] S. Saito, N. Tanaka, K. Fujimoto, H. Kogen, *Org. Lett.* 2000, 2, 505-506.
- [70] K. Bernardo, O. Krut, K. Wiegmann, D. Kreder, M. Micheli, R. Schafer, A. Sickman, W. E. Schmidt, J. M. Schroder, H. E. Meyer, K. Sandhoff, M. Kronke, *J. Biol. Chem.*, Vol. 275 2000, 7641-7647.
- [71] F. Nara, M. Tanaka, S. Masuda-Inoue, Y. Yamasato, H. Doi-Yoshioka, K. Suzuki-Konagai, S. Kumakura, T. Ogita, *J. Antibiot.* 1999, 52, 531-535.
- [72] A. B. Brann, R. Scott, Y. Neuberger, D. Abulafia, S. Boldin, M. Fainzilber, A. H. Futerman, *J. Neurosci.*, Vol. 19 1999, 8199-8206.
- [73] R. Uchida, H. Tomoda, Y. Dong, S. Omura, *J. Antibiot.* 1999, 52, 572-574.
- [74] M. Tanaka, F. Nara, Y. Yamasato, S. Masuda-Inoue, H. Doi-Yoshioka, S. Kumakura, R. Enokita, T. Ogita, *J. Antibiot.* 1999, 52, 670-673.
- [75] M. Tanaka, F. Nara, Y. Yamasato, Y. Ono, T. Ogita, *J. Antibiot.* 1999, 52, 827-830.
- [76] F. Nara, T. Ogita, K. Tanzawa, T. Hosoya, K. Furuya, *Can 124:28118*, (Sankyo Co, Japan)., Jp, 10 pp.
- [77] H. D. Becker, T. Bremholt, E. Adler, *Tetrahedron Lett.* 1972, 41, 4205-4208.
- [78] E. J. Corey, J. P. Dittami, *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 256-257.
- [79] S. Danishefsky, M. D. Shair, *J. Org. Chem.* 1996, 61, 16-44.
- [80] K. Hinterding, A. Knebel, P. Herrlich, H. Waldmann, *Bioorg. Med. Chem.* 1998, 6, 1153-1162.

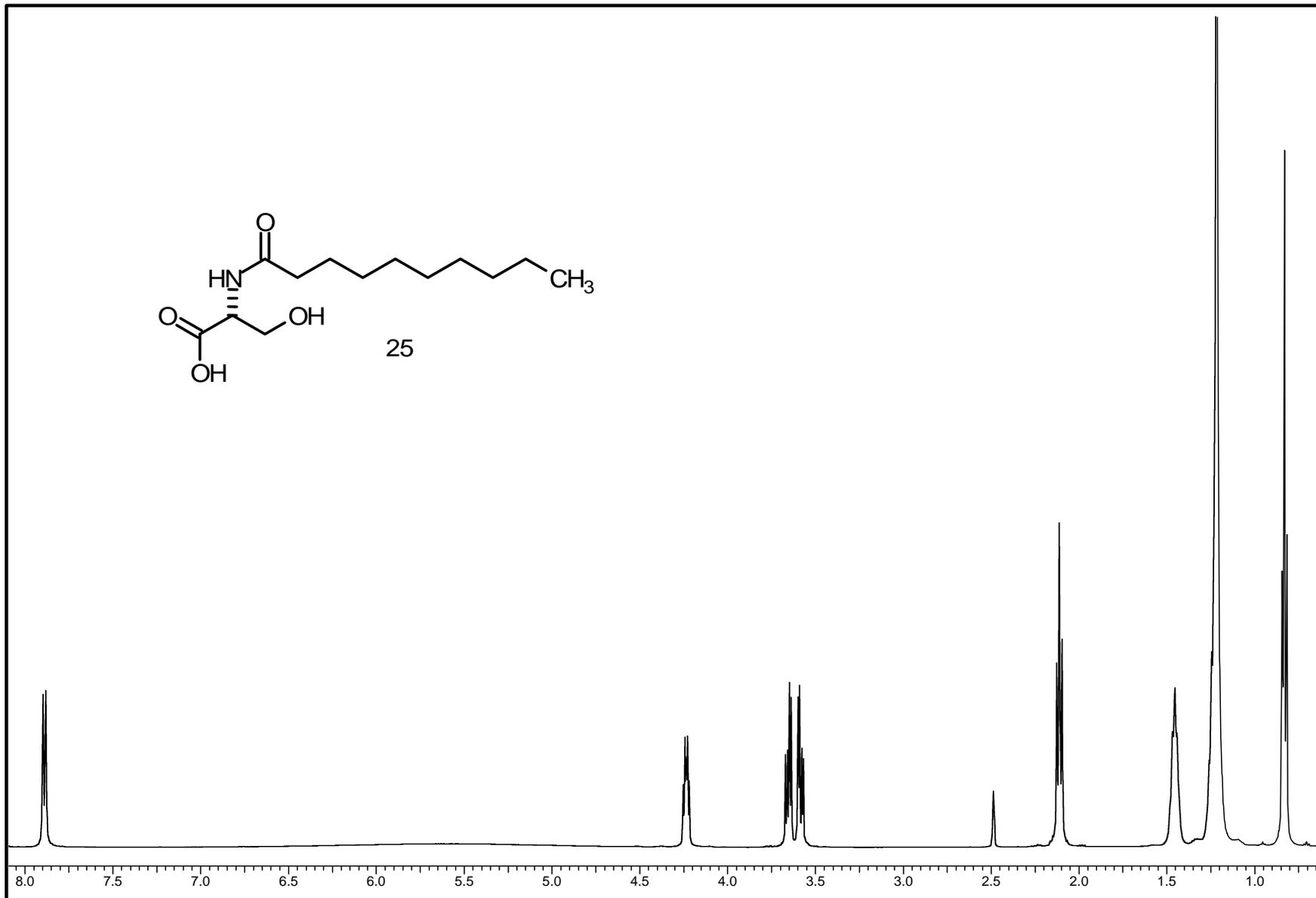
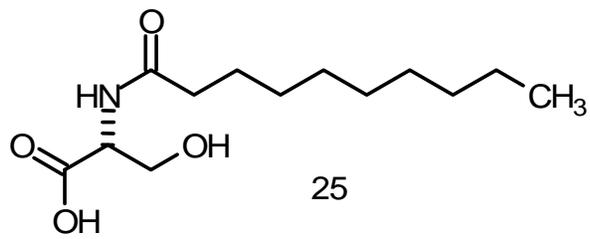
- [81] H. Waldmann, K. Hinterding, P. Herrlich, H. J. Rahmsdorf, A. Knebel, *Angew. Chem.* 1997, *109*, 1553-1555, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1997, *36*, 1541-1542.
- [82] A. Schick, T. Kolter, A. Giannis, K. Sandhoff, *Tetrahedron* 1995, *51*, 11207-11218.
- [83] A. Schick, T. Kolter, A. Giannis, K. Sandhoff, *Tetrahedron* 1996, *52*, 2945-2956.
- [84] C. Arenz, A. Giannis, *Eur. J. Org. Chem.*, im Druck.
- [85] A. Giannis, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* 1989, *101*, 220-222.
- [86] K. Sandhoff, A. Giannis, W. Steglich, , Ger. Offen. 1989.
- [87] J. Bonjoch, I. Serret, J. Bosch, *Tetrahedron* 1984, *40*, 2505-2511.
- [88] N. Toyooka, Y. Yoshida, Y. Yotsui, T. Momose, *J. Org. Chem.* 1999, *64*, 4914-4919.
- [89] A. Zeeck, K. Schroder, K. Frobel, R. Grote, R. Thiericke, *J. Antibiot.* 1987, *40*, 1530-1540.
- [90] A. Zeeck, K. Frobel, C. Heusel, K. Schroder, R. Thiericke, *J. Antibiot.* 1987, *40*, 1541-1548.
- [91] R. Thiericke, M. Stellwaag, A. Zeeck, G. Snatzke, *J. Antibiot.* 1987, *40*, 1549-1554.
- [92] O. Block, G. Klein, H.-J. Altenbach, D. J. Brauer, *J. Org. Chem.* 2000, *65*, 716-721.
- [93] C. Arenz, A. Giannis, *Angew. Chem.* 2000, *112*, 1498-1500; *Angew. Chem., Int. Ed.* 2000, *39*, 1440-1442.
- [94] V. F. Buzetti, E. Gäumann, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, L. Neipp, V. Prelog, H. Zähler, *Pharm. Acta Helv.* 1963, *38*, 871-874.
- [95] M. Hara, K. Akasaka, S. Akinaga, M. Okabe, H. Nakano, R. Gomez, D. Wood, M. Uh, F. Tamanoi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993, *90*, 2281-2285.
- [96] K. Sonoda, T. Sakamoto, H. Yoshikawa, S. Ashizuka, Y. Ohshima, K. Kishihara, K. Nomoto, T. Ishibashi, H. Inomata, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998, *39*, 2245-2251.
- [97] A. D. Campbell, T. M. Raynham, R. J. K. Taylor, *Synthesis* 1998, , 1707-1709.
- [98] A. Giannis, *Angew. Chem.* 1994, *106*, 188-191, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, *33*, 1178-1980.
- [99] P. N. Schröder, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bonn.
- [100] R. Zeitler, A. Giannis, S. Danneschewski, E. Henk, T. Henk, C. Bauer, W. Reutter, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* 1992, *204*, 1165-1168.
- [101] C. Arenz, Diplomarbeit, Universität Bonn 1997.
- [102] W. Meyer zu Reckendorf, L. Rolf, N. Wassiliadou-Micheli, *Carbohydr. Res.* 1975, *45*, 307-311.
- [103] J. J. Gaudino, K. Bjergarde, P.-Y. Chan-Hui, C. D. Wright, D. S. Thomson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, *7*, 1127-1132.

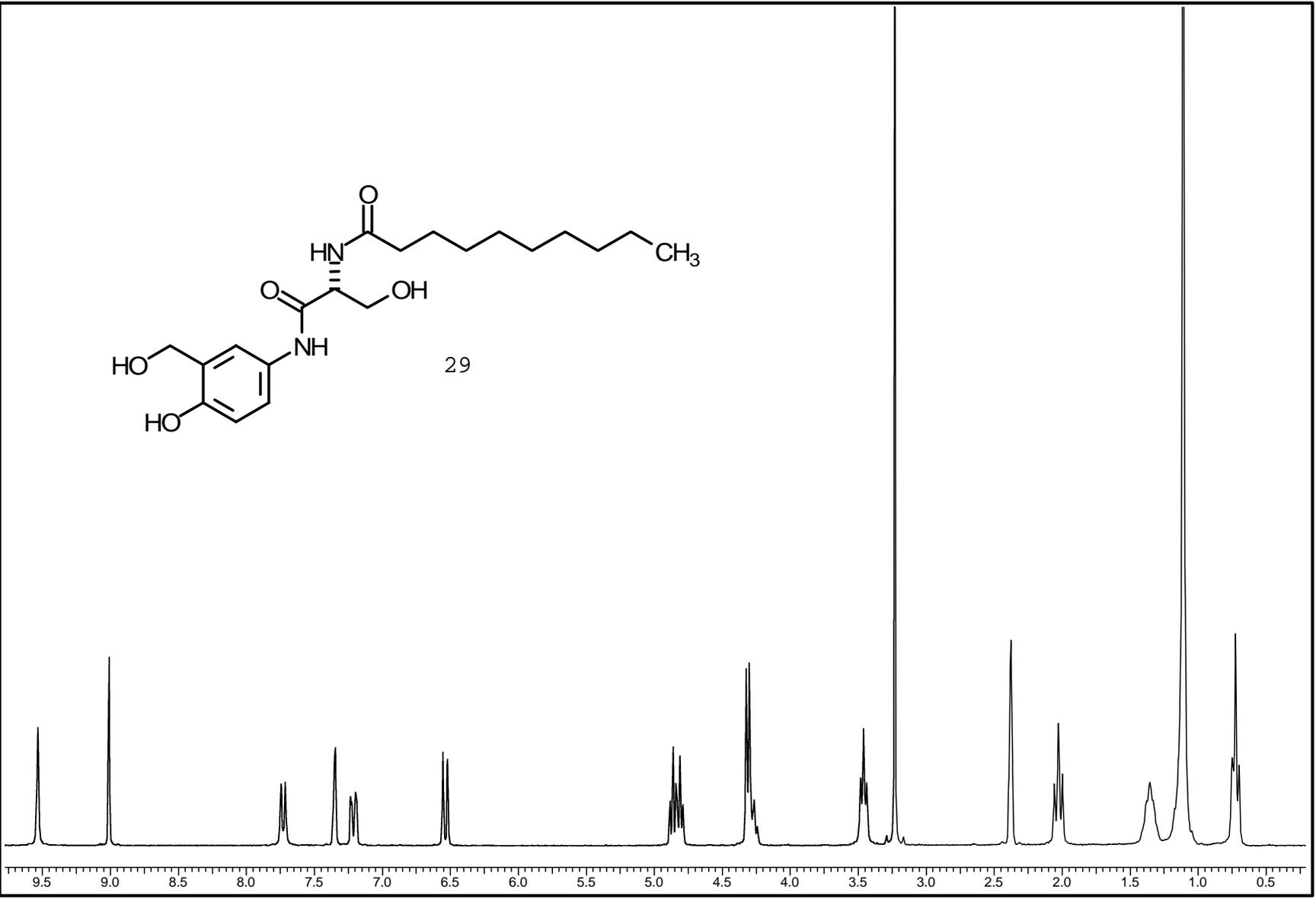
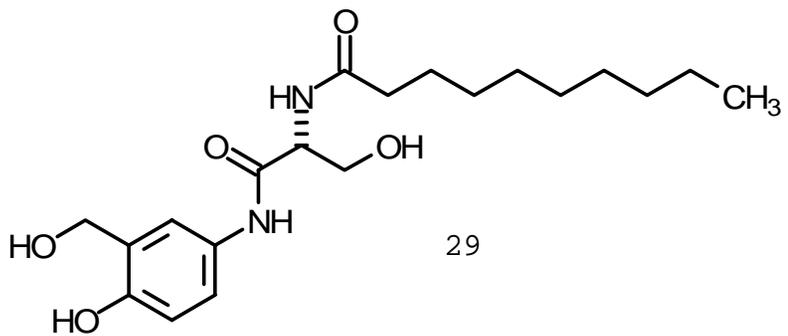
- [104] R. W. Ledeen, G. Chakraborty, *Neurochem. Res.* 1998, 23, 277-289.
- [105] T. Sciortino, G. Du Bun, *Boll. Chim. Farm.* 1968, 107, 498-505.
- [106] J. H. Bowie, A. C. Ho, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1975, 7, 724-728.
- [107] J. Bonjoch, I. Serret, J. Bosch, *Tetrahedron* 1984, 40, 2505-2511.
- [108] D. M. Bollag, M. D. Rozycki, S. J. Edelstein, *Protein Methods*, Wiley-Liss, New York 1996.

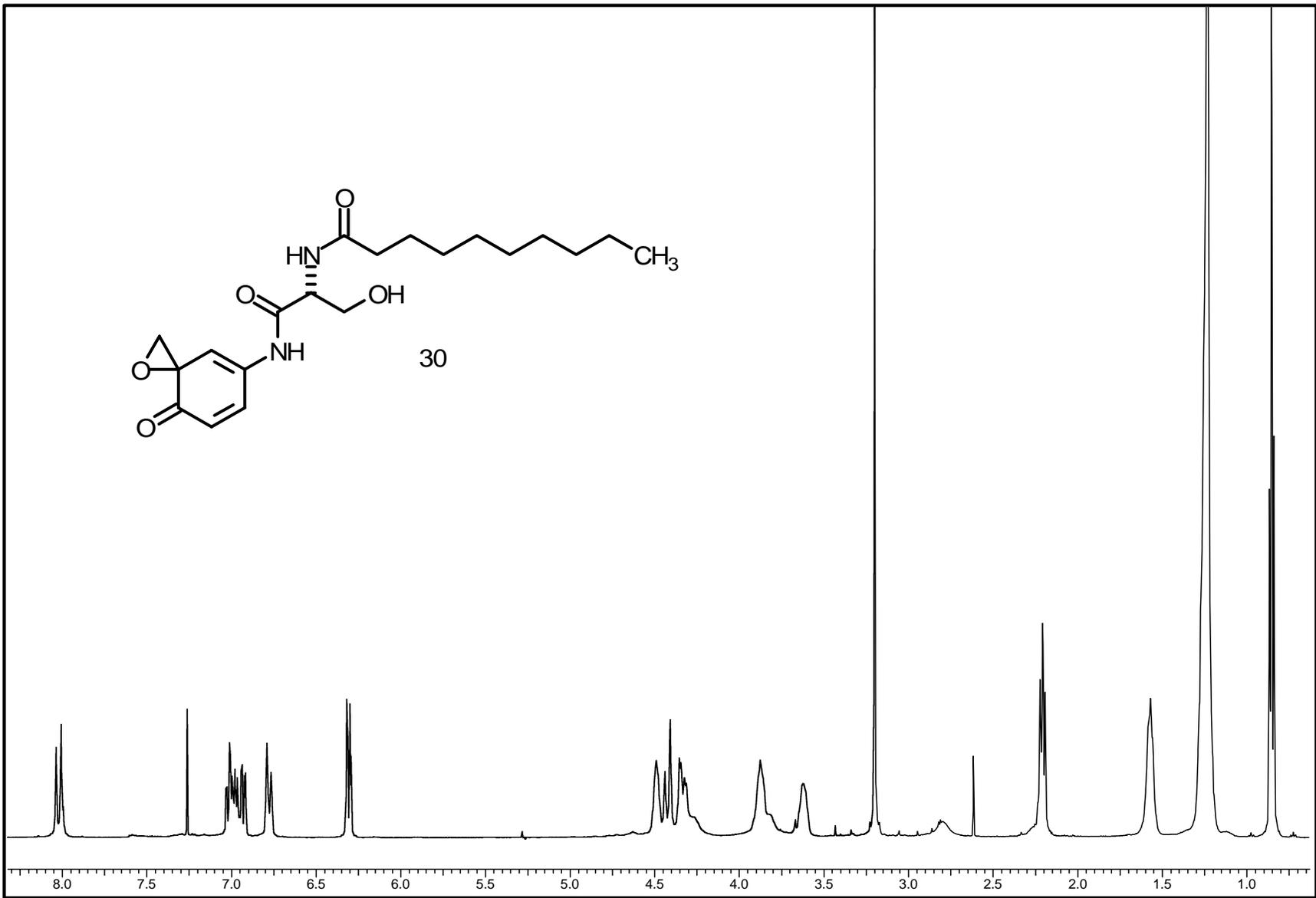
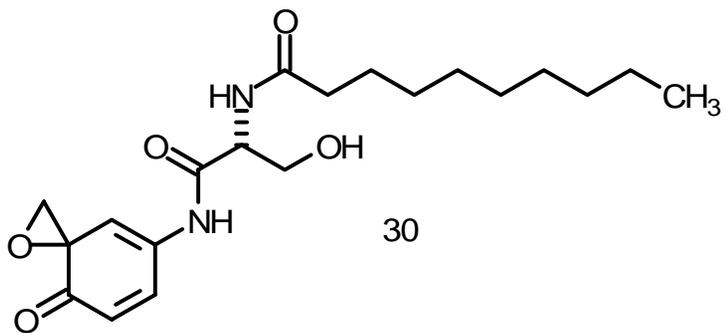
Anhang

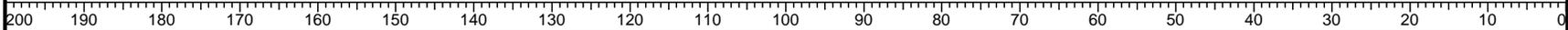
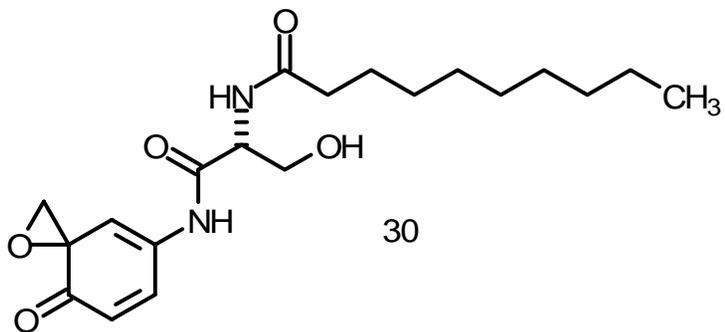
Elutionsprogramm für die N-SMase Reinigung mit der Biocad Sprint Anlage:

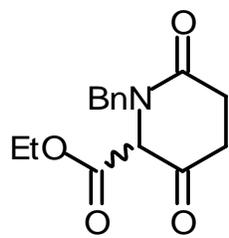
```
General Settings: UV Detector Wavelength = 220 nM and 280 nM
General Settings: Flow Rate = 7.00 ml/min
General Settings: Turn UV Detector Lamp On
Pump On
0.00 min Method Start
0.00 min [01]Equil Block
0.00 min (A) Step Segment
0.00 min 0.00 CV Set Solvent Blend 100% A:TRIS-HCl 2
1.19 min 10.00 CV Start Fraction Collection Frac 0.50ml*
1.19 min 10.00 CV End Solvent Blend 100% A:TRIS-HCl 2
1.19 min -----
1.19 min [02]Load Block
1.19 min (A) Step Segment
1.19 min 0.00 ml Load through Pump 100% F
4.04 min 20.00 ml Load through Pump 100% F
4.04 min -----
4.04 min [03]Wash Block
4.04 min (A) Step Segment
4.04 min 0.00 CV Set Solvent Blend 100% A:TRIS-HCl 2
4.28 min 2.00 CV End Solvent Blend 100% A:TRIS-HCl 2
4.28 min (B) Step Segment
4.28 min 0.00 CV Set Solvent Blend 100% C:TRIS/NaCl
4.88 min 5.00 CV End Solvent Blend 100% C:TRIS/NaCl
4.88 min -----
4.88 min [04]Elute Block
4.88 min (A) Gradient Segment
4.88 min 0.00 CV Start Gradient 100% C:TRIS/NaCl
6.06 min 10.00 CV End Gradient 100% D:TRIS/Trito
6.06 min -----
6.06 min [05]Clean Block
6.06 min (A) Step Segment
6.06 min 0.00 CV Set Solvent Blend 100% A:TRIS-HCl 2
6.06 min 0.00 CV Reset Fraction Collector*
6.06 min 0.00 CV Stop Fraction Collection*
6.66 min 5.00 CV End Solvent Blend 100% A:TRIS-HCl 2
6.66 min -----
6.66 min
```



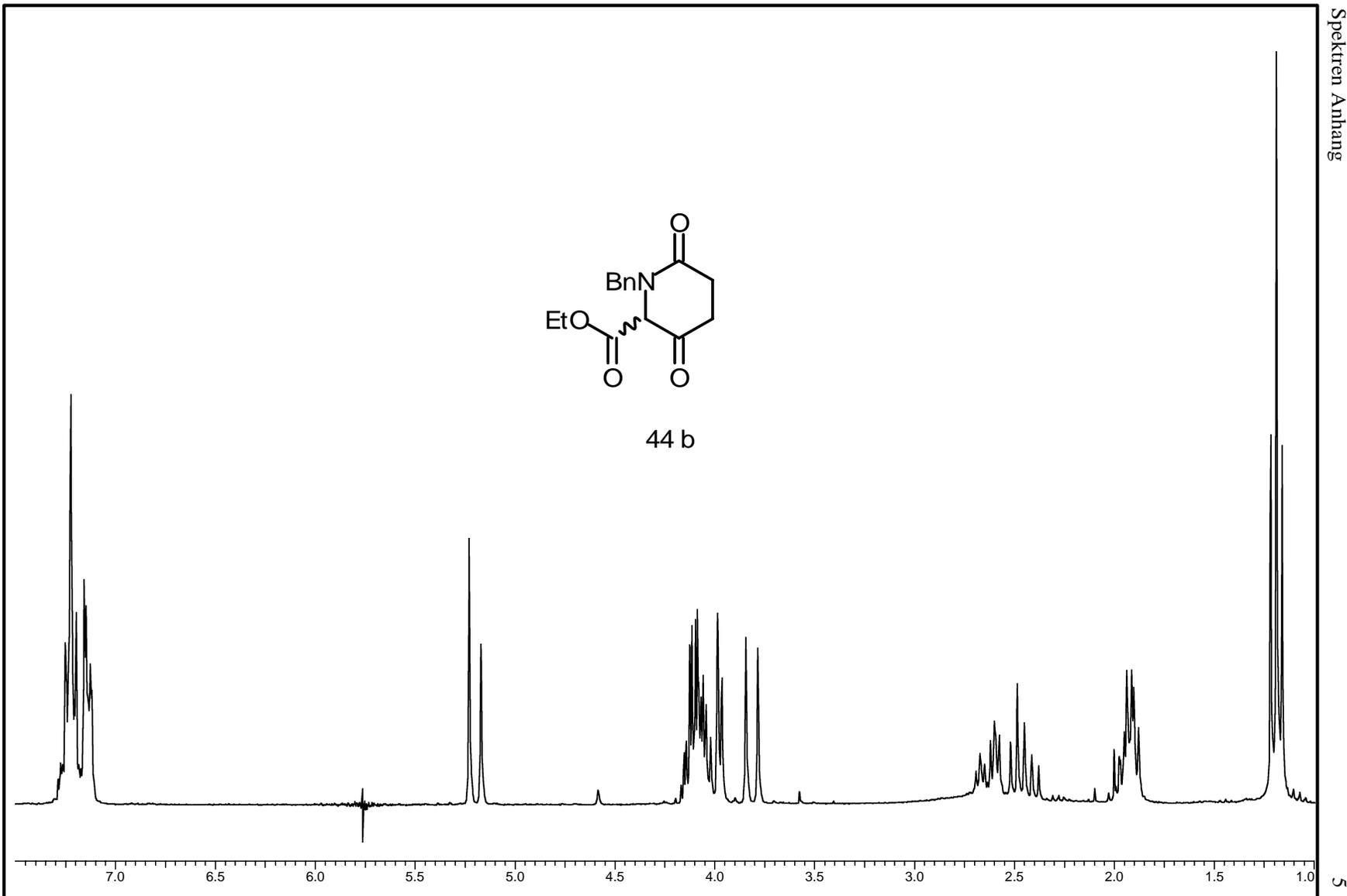


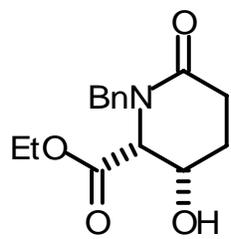






44 b





45

