

**Synthese und Anwendung von Glycothymidinen:
Multifunktionelle Moleküle für die Glycowissenschaften**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Helena Fernando

aus Taldy-Kurgan

Kiel 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. T. K. Lindhorst
2. Gutachter: Prof. Dr. F. D. Sönnichsen
Tag der Disputation: 08.07.2013
Zum Druck genehmigt: 08.07.2013

Der Dekan

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gemäß § 8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin, selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und wurde bisher bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Helena Fernando

Diese Arbeit wurde von Oktober 2008 bis Mai 2013 am Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Kirsten Schwekendiek, Hauke Kobarg, Lena Daumlechner, Frank D. Sönnichsen and Thisbe K. Lindhorst, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9399-9401, "Photodimerisation of glycothymidines in solution and in micelles".

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Abstract | III |
| Kurzfassung..... | IV |
| Allgemeine Abkürzungen..... | V |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Glykokonjugate als Bestandteil der Glycocalyx | 1 |
| 1.1.1 Aufbau und Funktion der eukaryontischen Zellmembran | 1 |
| 1.1.2 Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen | 5 |
| 1.1.3 Multivalenz | 7 |
| 1.2 Glycomimetika | 10 |
| 1.3 Konformationelle Kontrolle in Biosystemen..... | 12 |
| 2 Projektidee | 14 |
| 2.1 Konzept und Stand der Forschung | 14 |
| 2.1.1 Thymidin als Auslöser einer Konformationsänderung | 14 |
| 2.1.2 FimH: ein Lektin für die Untersuchung zellulärer Adhäsion | 17 |
| 2.1.3 Stand der Forschung..... | 20 |
| 2.2 Bisher ungelöste Fragen | 22 |
| 2.3 Lösungsansätze: neue Moleküle und Methoden | 23 |
| 3 Ergebnisse | 24 |
| 3.1 Charakterisierung von Glycothymidin-Arrays auf Polystyrol-Oberflächen..... | 24 |
| 3.1.1 Synthese und Anwendung Ester-gebundener Glycothymidin-Derivate..... | 27 |
| 3.1.2 Direkte Immobilisierung des Aminoglycothymidin-Dimers..... | 34 |
| 3.2 Thymidin-SAMs auf Goldoberflächen | 44 |
| 3.2.1 Synthese und Immobilisierung von Thymidinylthiol-Komponenten..... | 47 |
| 3.2.2 IRRAS-Messungen..... | 50 |
| 3.3 Glycothymidin-SAMs auf Quarzglasoberflächen..... | 55 |
| 3.3.1 Funktionalisierung der Quarzoberfläche durch Thioharnstoff-Kupplung | 58 |
| 3.3.2 Funktionalisierung der Oberfläche mit Hilfe der „Click-Chemie“ | 71 |
| 3.3.3 Funktionalisierung der Oberfläche durch Peptidkupplung | 76 |
| 3.4 Amphiphile Glycothymidin-Derivate | 78 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.4.1 | Synthese amphiphiler Glycothymidine..... | 79 |
| 3.4.2 | Darstellung von Glycoarrays durch nicht-kovalente, hydrophobe Bindung | 81 |
| 3.5 | Synthese divalenter Glycothymidin-Derivate..... | 85 |
| 3.5.1 | Divalente Glycothymidin-Thioharnstoffderivate | 86 |
| 3.5.2 | Di- und tetravalente Glycothymidin-Derivate auf Basis von PAMAM-Dendrimeren..... | 89 |
| 3.5.3 | Aliphatische Polyetherdendrimere: Synthese divalenter Glycothymidin-Derivate | 95 |
| 3.6 | Alkylierung von 2'-Desoxythymidin – ein Chemo- und Regioselektivitätsproblem... | 104 |
| 4 | Zusammenfassung | 110 |
| 5 | Experimenteller Teil..... | 114 |
| 5.1 | Allgemeine Arbeitsmethoden | 114 |
| 5.2 | Einzelvorschriften | 119 |
| 5.3 | Protokoll zur Glasbeschichtung | 163 |
| 5.4 | Protokoll zu den bakteriellen Adhäsionstests | 165 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 168 |

Abstract

Many details of carbohydrate-mediated cellular communication are not well understood so far. Therefore, besides other more classical questions that are asked in the glycosciences, there is a special interest to investigate if conformational control plays a role in carbohydrate recognition. Otherwise in biological chemistry, conformational rearrangement processes are much better appreciated and understood.

Referring to the initial results collected in the dissertation of K. SCHWEKENDIEK, this current research project is dedicated to the synthesis and immobilisation of glycothymidine derivatives on surfaces as conformationally sensitive photoswitches, their photoinduced dimerisation and the resulting properties of respective glycoarrays.



Thus, glycothymidine-decorated surfaces were tested in mannose-specific adhesion of type-1-fimbriated *E. coli* bacteria and the results were correlated with the molecular characteristics of a particular glycoarray surface, as much as possible. Hence, it has been critical to prove glycothymidine dimerisation on the surface as a result of photoirradiation and to exclude false-positive results as a consequence of unspecific surface effects.

As the spectroscopic characterisation of glycoarrays on polystyrene microtiterplates is limited, several alternative approaches were tested, such as introduction of a predetermined breaking point into glycothymidine arrays to allow cleavage from the surface after irradiation and spectroscopic characterization of the respective molecules. As this attempt was not successful, further efforts were spent on immobilisation of glycothymidine dimers that were prepared in solution before utilisation on surface. Then, adhesion assays with *E. coli* cells were performed with these surfaces. An increased adhesion was found for dimer-functionalised surfaces compared to the monomer-functionalised analogues.

In addition to polystyrene, silica glass and gold surfaces were employed for the immobilisation of glycothymidines. These materials are amenable to different spectroscopic characterisation methods. Thus, thymidine thiol derivatives have been immobilised via SAM formation on gold surfaces and investigated by infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS). In case of glycoarrays on silica glass, proof of thymine dimerisation via [2+2]-cycloaddition on the surface was successful using UV-spectroscopy.

To mimic the supramolecular characteristics of the glycocalyx, amphiphilic glycothymidine derivatives were synthesised and immobilised on UV-permeable polyethylene surfaces via hydrophobic interactions. This non-covalent immobilisation allows lateral diffusion of glycoconjugates like in the cell membrane.

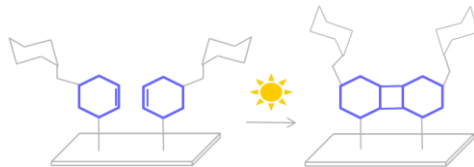
Modern molecular architecting has also led to divalent glycothymidine derivatives in this thesis. Here, thiourea coupling was used as well as solid phase-Synthesis of dendrimer scaffolds. In addition, heterodimeric glycothymidine derivatives, based on aliphatic polyether dendrimers, were prepared.

In conclusion, glycothymidines have been advanced in different experimental context as photosensitive probes to address the problem of conformational control of carbohydrate recognition.

Kurzfassung

Viele Details der Kohlenhydrat-abhängigen zellulären Kommunikation sind bislang unverstanden. Hier war besonders interessant zu prüfen, ob bei der Kohlenhydrat-Erkennung, wie bei zahlreichen anderen biochemischen Kommunikationsprozessen konformationelle Kontrolle eine Rolle spielt. Dabei ist es denkbar, dass hier beispielsweise eine Rezeptor-Ligand-Interaktion zu einer konformationellen Veränderung führt und so ein Informationsaustausch ermöglicht bzw. induziert wird.

Aufbauend auf der Dissertation von K. SCHWEKENDIEK beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Synthese und Immobilisierung von Glycithymidin-Derivaten, ihrer photoinduzierten Dimerisierung durch [2+2]-Cycloaddition und der Eigenschaften der entsprechenden Oberflächen.



Die biologische Untersuchung der glycosylierten Oberflächen erfolgte durch Mannose-spezifische Adhäsion Typ-1-fimbrierter *E. coli*-Bakterien. Um die Ergebnisse der bakteriellen Adhäsionstests eindeutig interpretieren zu können, ist es wichtig die molekulare Struktur der Glycithymidin-Oberfläche infolge der Belichtung zu kennen. Zum einen muss die erfolgte Dimerisierung auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Zum anderen ist eine Zerstörung von Polystyroloberflächen durch die energiereiche Strahlung zu untersuchen bzw. auszuschließen. Die direkte Charakterisierung der verwendeten Polystyrol-Mikrotiterplatten war bislang ergebnislos. Daher wurde eine indirekte Oberflächencharakterisierung durch die Darstellung von Glycithymidin-Arrays mit eingebauter Sollbruchstelle angestrebt. Hierfür wurden Glycithymidin-Derivate mit integrierter Estergruppe dargestellt und auf Polystyroloberflächen immobilisiert. Nach basischer Spaltung des Esters konnten die Spaltprodukte in Lösung analysiert werden.

Des Weiteren wurde die direkte Immobilisierung des zuvor in Lösung dargestellten und isolierten Glycithymidin-Dimers genutzt, um den Dimerisierungsgrad auf der Oberfläche sicherzustellen und gleichzeitig eine Bestrahlung der Oberfläche zu vermeiden. Adhäsionsstudien mit *E. coli*-Bakterien zeigten in diesem Fall eine erhöhte Bindungsaffinität für die Dimer-funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zu den mit dem Monomer funktionalisierten.

Neben Polystyrol gibt es weitere Oberflächen die sich für die Immobilisierung der Glycithymidine eignen. Quarzglas und Gold beispielsweise haben im Vergleich zum Polystyrol den Vorteil, dass sie verschiedene spektroskopische Charakterisierungsmöglichkeiten zulassen. Es wurden daher Thymidinylthiol-Derivate über SAM-Bildung auf Goldoberflächen immobilisiert und mit Hilfe der Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) untersucht. Quarzoberflächen konnten ebenfalls zur Immobilisierung von Glycithymidin-Verbindungen genutzt werden. Die Dimerisierung der Thyminderivate auf Quarzoberflächen konnte mit Hilfe der UV-Spektroskopie verfolgt werden. Hier konnte erstmals die [2+2]-Cycloaddition auf der Oberfläche nachgewiesen werden.

Um die natürliche Zelloberfläche in ihrem supramolekularen Zusammenhang zu mimikrieren wurden außerdem amphiphile Glycithymidin-Derivate dargestellt und über hydrophobe Wechselwirkungen an UV-transparente Polyethylenoberflächen gebunden. Diese nicht-kovalente Bindung soll eine laterale Diffusion der Glycokonjugate erlauben, wie sie auch im natürlichen Zellverbund möglich ist.

Neben den bereits genannten monovalenten Glycithymidin-Derivaten wurden verschiedene Synthesewege zur Darstellung divalenter Derivate erarbeitet. Die Thioharnstoffkupplung wurde für die Darstellung eines divalenten Glycithymidin-Thioharnstoffs verwendet. Ein weiteres divalentes Glycithymidin-Derivat konnte mit Hilfe der Dendrimerchemie an fester Phase synthetisiert werden. Darüber hinaus konnte ein heterogenes, divalentes Glycithymidin-Derivat auf Basis von aliphatischen Polyetherdendrimeren hergestellt werden.

Allgemeine Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| abs. | absolut |
| Ac | Acetyl |
| AFM | <i>engl.</i> : atomic force microscopy |
| Äquiv. | Äquivalente |
| ATR | <i>engl.</i> : attenuated total reflection |
| ber. | berechnet |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| BSA | <i>engl.</i> : bovine serum albumine |
| c | Konzentration |
| CCA | <i>engl.</i> : α -cyano-4-hydroxycinnamic acid |
| cm ⁻¹ | Wellenzahl |
| COSY | <i>engl.</i> : correlated spectroscopy |
| CRD | <i>engl.</i> : carbohydrate recognition domain |
| Cy | Cyclohexan |
| δ | chemische Verschiebung in ppm |
| d | Tag |
| d (NMR) | Dublett |
| DBU | 1,8-Diazobicyclo[5.4.0.]undec-7-en |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| DEPT | <i>engl.</i> : distortionless enhancement by polarization transfer |
| DHB | 2,5-Dihydroxybenzoesäure |
| DIPEA | <i>N</i> -Diisopropyl- <i>N</i> -ethylamin |
| DMAP | <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DMT | 4,4'-Dimethoxytrityl |
| EA | Elementaranalyse |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | <i>engl.</i> : enzyme linked immunosorbent assay |
| ESI | <i>engl.</i> : electrospray ionisation |

VI | Allgemeine Abkürzungen

| | |
|----------------------|--|
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FT | Fourier Transformation |
| Fmoc | Fluorenylmethoxycarbonyl |
| g | Gramm |
| gef. | gefunden |
| ges. | gesättigt |
| GFP | <i>engl.</i> : green fluorescent protein |
| GPC | Gelpermeationschromatographie |
| h | Stunde(n) |
| HPLC | <i>engl.</i> : high performance liquid chromatography |
| Hz | Hertz |
| IR | Infrarot |
| IRRAS | Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie |
| Isopr | Isopropyliden- |
| ITC | <i>engl.</i> : isothermal titration calorimetry |
| IUPAC | International Union for Pure and Applied Chemistry |
| J | Kopplungskonstante |
| m | Meter |
| m (NMR) | Multiplett |
| m _c (NMR) | zentriertes Multiplett |
| MDC | Methallyldichlorid |
| mg | Milligramm |
| mL | Milliliter |
| mol | Mol |
| M | Molmasse |
| M | Molarität |
| MALDI | <i>engl.</i> : matrix assisted laser desorption ionisation |
| Me | Methyl |
| MeMan | Methyl- α -D-mannosid |
| min | Minuten |
| MS | Massenspektrometrie |
| nm | Nanometer |
| NMR | <i>engl.</i> : nuclear magnetic resonance |
| org | organisch |
| PAMAM | Polyamidoamin |

| | |
|----------------|---|
| PBS | <i>engl.</i> : phosphate buffered saline |
| PBST | <i>engl.</i> : phosphate buffered saline tween |
| Ph | Phenyl |
| PM | Polarisations-Modulations |
| <i>p</i> NPMan | <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-mannosid |
| ppm | <i>engl.</i> : parts per million |
| q (NMR) | Quartett |
| quant. | quantitativ |
| R | Rest |
| Ribo | Ribose |
| R_f | Retentionsfaktor |
| RT | Raumtemperatur |
| s (NMR) | Singulett |
| SAM | <i>engl.</i> : self assembled monolayer |
| Schmp | Schmelzpunkt |
| SDS | <i>engl.</i> : sodium dodecyl sulfate |
| sec | Sekunden |
| t (NMR) | Triplett |
| TBAF | Tetrabutylammoniumfluorid |
| TBAI | Tetrabutylammoniumiodid |
| TBDMS | <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl |
| TBDPS | <i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Thy | Thymidin |
| TMS (NMR) | Trimethylsilan |
| ToF | Time of Flight |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| wässr | wässrig |
| XPS | <i>engl.</i> : X-ray photoelectron spectroscopy |

1 Einleitung

1.1 Glycokonjugate als Bestandteil der Glycocalyx

1.1.1 Aufbau und Funktion der eukaryontischen Zellmembran

Alle eukaryontischen Zellen sind ähnlich aufgebaut, weisen jedoch erstaunlicherweise die Fähigkeit auf, unterschiedliche Funktionen im Organismus auszuführen. Diese Differenzierungsfähigkeit beruht auf dem Prinzip, dass gleichartige Zellen in der Lage sind sich zu erkennen und zu Verbänden zusammenzuschließen. Dieser Vorgang setzt einen enormen Informationsaustausch zwischen den Zellen voraus.^[1,2] Neben den Proteinen und Nukleinsäuren stellen die Glycokonjugate eine der drei großen Substanzklassen der Biomakromoleküle dar, welche für den Informationsaustausch zwischen den Zellen verantwortlich sind. Die Kohlenhydrateinheiten der Glycokonjugate sind so vielfältig und komplex, dass sie für die molekulare Verschlüsselung biologischer Informationen geradezu prädestiniert erscheinen. Neben den linearen Strukturen sind auch stark verzweigte Oligomere am Aufbau der Glycokonjugate beteiligt. Die Anzahl von Stereozentren, möglichen Stereoisomeren und verschiedenen Ringgrößen, sowie von Substitutionsmustern der Hydroxygruppen liefert ein komplexes Informationsspeichersystem, welches auch als „Glycocode“ bezeichnet wird.^[3-7] Glycoproteine, Glycolipide und Proteoglykane sind die Hauptbestandteile der Glycocalyx eukaryontischer Zellen und von fundamentaler Bedeutung für viele wichtige biologische Prozesse wie die Zell-Zell-Erkennung, die körpereigene Immunantwort und die Fertilisation.^[8-12]

Eukaryontische Zellen sind von einer Membran umgeben, die aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Diese Lipiddoppelschicht ist aus verschiedenen Lipiden aufgebaut, welche durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden und enthält verschiedene eingelagerte Moleküle wie Proteine. Diese Membranen sind strukturell und funktionell asymmetrisch, d. h. die äußeren und inneren Grenzschichten unterscheiden sich sowohl strukturell als auch funktionell voneinander.

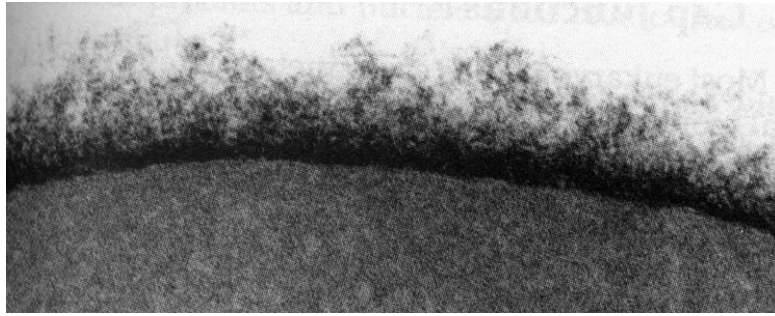


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glycocalyx einer Erythrozytenzelle.^[13]

Die extrazelluläre Oberfläche eukaryontischer Zellen ist von einer etwa 100 nm dicken, schwer charakterisierbaren Kohlenhydrathülle umgeben (Abbildung 1), in welcher Glycokonjugate mit stark verzweigten Ketten aus Mono- und Oligosaccharid-Einheiten in Form von Glycolipiden, Glycoproteinen und GPI-Ankern in der Zellmembran verankert sind. Intrazellulär im rauen endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat gebildet, werden sie von Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert,^[14,15] wo der Proteinanteil der Glycoproteine bzw. der Ceramidteil der Glycolipide die Glycokonjugate so auf der Außenseite der Membran verankert, dass die Kohlenhydratketten in den extrazellulären Raum hinausragen (Abbildung 2). Diese Zuckerkonjugatschicht auf der Zelloberfläche wird als Glycocalyx bezeichnet.

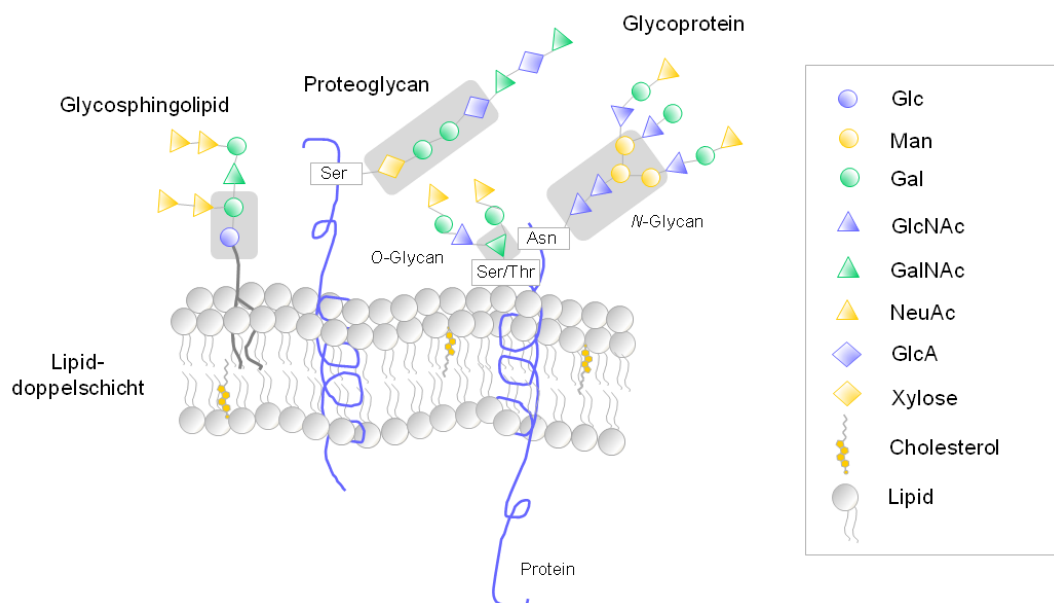


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Glycocalyx. Glycolipide, Proteoglykane und Glycoproteine sind die Hauptbestandteile der Glycocalyx. Die Kernstrukturen der jeweiligen Glycokonjugate sind grau hinterlegt; abgewandelt nach PAULSON.^[16]

Der Kohlenhydratanteil der Zellmembran liegt bei 2 bis 10 %, wobei die Oligosaccharid-Einheiten der Glykokonjugate aus bis zu 20 unterschiedlichen Monomeren aufgebaut sind. Die Zusammensetzung der Glycocalyx ist nicht statisch, sie ändert sich im Laufe der Zellentwicklung, außerdem ist sie zellspezifisch und nicht nur von der Entwicklung der Zelle abhängig sondern auch von deren Gesundheitszustand.^[17] Das Glycom einer Zelle hat also einen ganz anderen Charakter als das Genom.

Je nach Bindung der Kohlenhydrate an das Protein unterscheidet man *N*- und *O*-Glycoproteine und GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol-Anker). Im Fall einer *N*-glycosidischen Verknüpfung des Saccharids mit dem Protein ist eine *N*-Acetylglukosamin-Einheit an den Amidstickstoff einer Asparaginseitenkette gebunden, bei der *O*-glycosidischen Verknüpfung ist das Saccharid über das Sauerstoffatom einer Serin- oder Threoninseitenkette mit dem Protein verknüpft. Im Fall von GPI-Ankern erfolgt die Verknüpfung über Ethanolaminphosphat-Linker. Alle *N*-Glykane haben eine pentasaccharidische Core-Struktur, bestehend aus zwei *N*-Acetylglukosamin- und drei Mannose-Einheiten, gemeinsam (Abbildung 3). Von dieser Struktur ausgehend werden verzweigte Glycoproteine aufgebaut, die sich in high mannose-, hybrid type- und complex-Glycoproteine gliedern lassen.^[17,18]

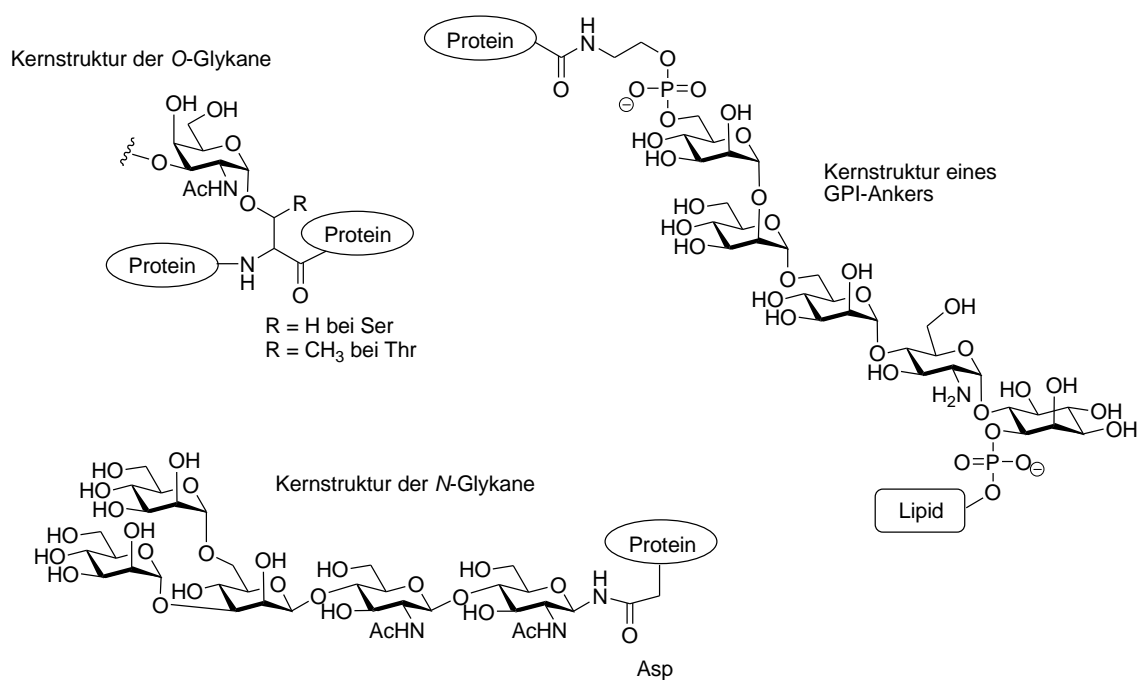
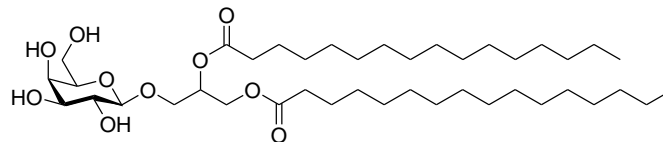


Abbildung 3: Kernstrukturen der *N*- und *O*-Glykane und der GPI-Anker. Ausgehend von diesen Kernstrukturen werden größere, stark verzweigte Glycoproteine aufgebaut.

Glycolipide bilden den mengenmäßig größten Bestandteil der in der Zellmembran verankerten Glykokonjugate. Bei den Glycolipiden handelt es sich um amphiphile Membranlipide, die über ihren unpolaren Lipidteil glycosidisch mit einem Mono- oder Oligosaccharid verbunden sind. Der Lipidteil besteht entweder aus einem 1,2-Diacylglycerinrest oder aus dem Fettsäureamid von *N*-Acylsphingosin.^[19,20] Die Saccharidstruktur kann entweder wie bei den Cerebrosiden aus einer Galaktose- oder Glukoseeinheit bestehen oder wie bei den Gangliosiden aus komplexen Oligosaccharidstrukturen aufgebaut sein.^[10,21,22] Bekannte Vertreter der Glycolipide sind die Glycoglycerolipide und die Glycosphingolipide (Abbildung 4).^[23]

a) Galaktosyldiacylglycerid - ein Glykoglycerolipid



b) Galaktosylcerebrosid - ein Glycosphingolipid

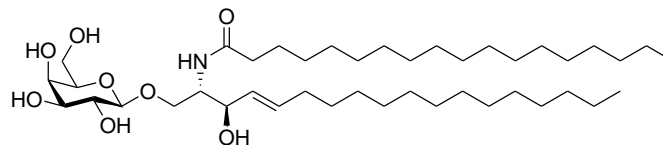


Abbildung 4: Exemplarische Vertreter der in der Zellmembran verankerten Glycolipide. Die Klasse der Glycolipide wird unterteilt in die Glycoglycerolipide (a) und die Glycosphingolipide (b).

Forschungen im Bereich der Glycobiologie haben ergeben, dass die Glycocalyx eine wichtige Rolle bei der zellulären Kommunikation und der Zelldifferenzierung spielt.^[24] Dabei ist die saccharidische Strukturvielfalt wahrscheinlich bedeutend für wichtige biologische Prozesse wie Befruchtung, Zell-Zell-Adhäsion und Immunantwort. Auch bei Krankheiten wie beispielsweise Entzündungen, Zell-Degeneration sowie bei mikrobiellen Infektionen kommt ihr eine beachtliche Rolle zu. Während sich gleichartige Zellen erkennen und zu Verbänden zusammenschließen können, kommt es beim Eindringen von Fremdkörpern zur Bildung von Antikörpern. Ein anschauliches Beispiel Zell-spezifischer Glycosylierungsmuster liefert das A,B,0-Blutgruppensystem. So führen minimale Unterschiede im Aufbau der Kohlenhydratepitope der Erythrozyten zur Differenzierung der entsprechenden Blutgruppenantigene. Allen Blutgruppen gemeinsam ist eine an 2-Position eines D-Galaktosids gebundene L-Fucose. Hinsichtlich der Substitution an 3-Position des Galaktosids unterscheiden sich die Blutgruppen. Während die Blutgruppe A an dieser Stelle mit *N*-Acetylgalaktosamin funktionalisiert ist, trägt Blutgruppe B dort

eine D-Galaktose. Die Blutgruppe 0 hingegen ist an dieser Stelle unsubstituiert (Abbildung 5). Bei Transfusion der falschen Blutgruppe führt bereits dieser minimale Unterschied im Aufbau der Kohlenhydratepitope zur Antikörperbildung und letaler Hämagglutination.^[25,26]

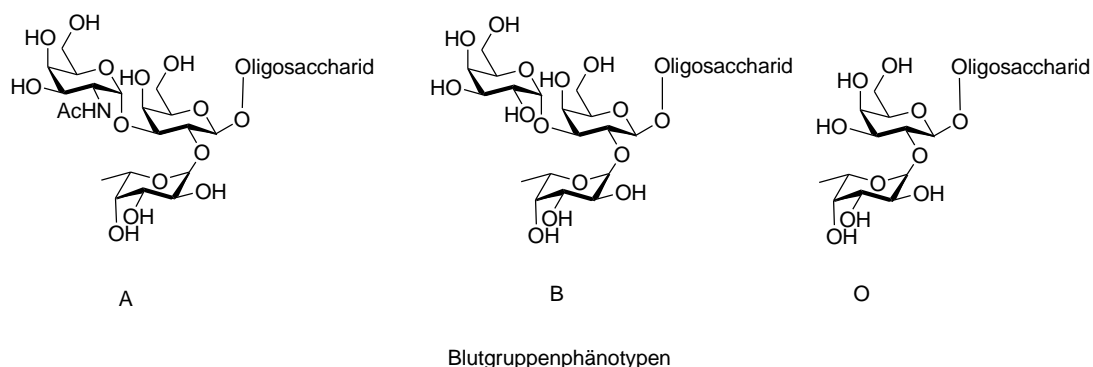


Abbildung 5: Darstellung des A,B,0-Blutgruppensystems mit den entsprechenden Kohlenhydrat-epitopen der Erythrozyten.

Die Mechanismen, die den biologischen Funktionen der Glycocalyx zugrunde liegen, sind nicht umfassend geklärt. So spielt die Erforschung der biologischen Funktion der Glycocalyx weiterhin eine große Rolle in der Glycobiologie.^[9,17,27–29]

1.1.2 Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen

Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und verschiedenen Proteinrezeptoren sind von fundamentaler Bedeutung für viele biologische Prozesse. Sie basieren auf der Erkennung und der reversiblen Bindung von hochspezifischen Proteinen. So wechselwirken zum Beispiel Enzyme, Antikörper und andere kohlenhydratspezifische Proteine, vor allem Lektine, mit Kohlenhydraten der Zelloberfläche.^[30–33] Kohlenhydratbindende Proteine, die weder eine Enzymaktivität besitzen noch Antikörper sind, werden Lektine genannt. Meist handelt es sich hierbei um integrale Membranproteine, die ihre kohlenhydraterkennende Domäne (engl. carbohydrate recognition domain, CRD) auf der extrazellulären Seite der Membran tragen. Lektine kommen aber auch in gelöster Form vor, zum Beispiel im Serum oder im Interzellularraum. Lektine enthalten eine oder mehrere CRDs, die einen Saccharidliganden komplexieren können.^[7,17] Diese Komplexierung beruht auf dem Zusammenspiel von Wasserstoffbrückenbindungen, die oft über Wassermoleküle oder

Ca²⁺-Ionen vermittelt werden, sowie hydrophoben Wechselwirkungen zwischen aromatischen Resten der Proteine und den hydrophoben Anteilen der Kohlenhydratstrukturen.^[13,34] Lektine können so Monosaccharide aber auch Oligosaccharidstrukturen spezifisch erkennen und binden.^[27] Besitzen Lektine mehr als eine CRD können sie Quervernetzungen zwischen Zellen ausbilden. Das *Mannose Binding Protein-A* (MBP-A) beispielsweise kommt im Serum höherer Säugetiere vor und besitzt drei Bindungsstellen für Kohlenhydrate. Hier entsteht nur dann eine starke Bindung, wenn alle drei Bindungsdomänen eines MBP-A-Moleküls gleichzeitig mit Liganden wechselwirken. Die Interaktion einer Bindungsstelle mit einer einzelnen Mannose-Einheit ist relativ schwach. Das Lektin MBP-A erkennt Pathogene im tierischen Organismus als feindlich und agglutiniert diese. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass eine Trimer-Bindung aufgrund des Bindungsabstands nur mit den Kohlenhydratstrukturen von Pilzen und Bakterien, nicht jedoch mit Säugetieroligosacchariden, möglich ist.^[35,36]



Abbildung 6: Das trimere MBP-A-Lektin mit Calciumionen (grün) und drei gebundenen Kohlenhydrat-Liganden (rot).^[35]

Die einzelnen Lektine unterscheiden sich stark in ihrer Größe, Struktur und in der Art der Kohlenhydratbindung und bilden so eine sehr heterogene Klasse von Proteinen. Die Klassifizierung erfolgt anhand von Struktur und Aminosäuresequenz ihrer CRDs. Man unterscheidet Lektine vom C-, P-, I- und S-Typ. Die C-Typ-Lektine stellen dabei die größte Klasse der tierischen Lektine dar und werden weiter in endozytotische Lektine, Kollektine und Selektine unterteilt. Endozytotische Lektine sind membrangebundene Rezeptoren mit einer breiten Kohlenhydratspezifität, Kollektine hingegen sind lösliche

Proteine des Serums. Lektine, die selektive Kontakte zwischen sialidierten Zellen bewirken können, werden Selektine genannt. Sie werden entsprechend ihrer Bindung an exponierte Kohlenhydrate des Endothels (E-Typ), der Lymphozyten (L-Typ) oder aktivierter Thrombozyten (P-Typ) differenziert und spielen eine wichtige Rolle im Frühstadium von Entzündungsreaktionen. Dabei interagieren sie mit Sialyl-Lewis^x-Einheiten der Leukozytenoberfläche. Dies führt an der Stelle des Entzündungsherdes zur Abbremsung der Leukozyten im Blutstrom, so dass sie an dieser Stelle durch das Endothel zum Entzündungsherd bewegt werden können.^[7,28,37]

Auch wenn Lektine und ihre Wechselwirkungen mit Kohlenhydraten gut untersucht sind, so sind die organismischen Konsequenzen bisher nicht umfassend verstanden. Das Auftreten von Multivalenz ist ein entscheidender Aspekt, dessen Untersuchung zum Verständnis von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen und ihrer biologischen Funktion beitragen kann.

1.1.3 Multivalenz

Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen basieren auf verschiedenen nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen, Ion-Dipol-Wechselwirkungen, π - π -Interaktionen oder van-der-Waals-Kräften. Diese Wechselwirkungen werden häufig über Wassermoleküle vermittelt. Allerdings sind die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zwischen einzelnen Saccharid-Einheiten und ihren Proteinrezeptoren sehr schwach und oft eher unspezifisch. Ihre Dissoziationskonstanten liegen im millimolaren oder hohem mikromolaren Bereich, so dass rätselhaft ist, wie sie eine effektive biologische Antwort induzieren können.^[38] Häufig beobachtet man in biologischen Systemen jedoch multivalente Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, bei denen vielfach exponierte Saccharidliganden mit einer entsprechenden Anzahl an Proteinrezeptoren interagieren. Sowohl die Avidität als auch die Spezifität der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung, die durch diese Multivalenz erreicht wird, ist dabei größer als die Summe der einzelnen Rezeptor-Ligand-Affinitäten.^[39,40] Dieser Effekt wird im Bereich der Glycowissenschaften als *glycoside cluster effect* bezeichnet.^[29,41-43] Er wurde erstmals 1978 von Y. C. LEE bei der Untersuchung von einfachen Glycoclustern beschrieben, die einen exponentiellen Zusammenhang zwischen ihrer Avidität und der Ligandenzahl zeigten.^[44]

Multivalenzeffekte spielen eine große Rolle für viele biochemische Systeme. Sie können das Auftreten von Scherkräften bei Zelladhäsionsprozessen verhindern und übernehmen die Feinsteuerung biochemischer Aktionen und Signale, beispielsweise über die Aggregation von multivalenten Glycoprotein-Rezeptoren auf der Zelloberfläche.^[45,46] Neben der multivalenten Präsentation der Kohlenhydratliganden, sind auch Lektine auf verschiedene Art multivalent. Einige Lektine, zum Beispiel der Mannose-Macrophagen-Rezeptor (MMR),^[35] weisen mehrere CRDs innerhalb eines Polypeptids auf. Andere Lektine liegen geclustert in der Zellmembran vor oder bilden oligomere Strukturen, wie das pflanzliche Lektin ConA, das in dimerer oder tetramerer Form vorliegen kann. Entsprechend gibt es für multivalente Liganden verschiedene Möglichkeiten an Rezeptoren zu binden (Abbildung 7).^[47,48] Bei der Chelatbildung bindet ein Rezeptor mit mehreren Bindungsstellen gleichzeitig mehrere Bindungseinheiten eines Liganden. Eine Aggregation tritt dann auf, wenn ein oligomerer Ligand bewirkt, dass sich mehrere Rezeptoren zu einem Komplex zusammenschließen. Außerdem kann direkt im Anschluss an die Auflösung einer Bindung aufgrund der großen Anzahl an unmittelbar benachbarten Liganden eine zufällige Bindung an den nächsten Liganden entstehen. Die Bindung an eine Nebenstelle kann dann Affinität verbessern, wenn der Rezeptor neben der Hauptbindungsstelle weitere Bindungsstellen aufweist. In der Praxis können die Bindungsmechanismen nicht strikt voneinander unterschieden werden. Es treten auch Variationen der klassischen Bindungsmechanismen auf.

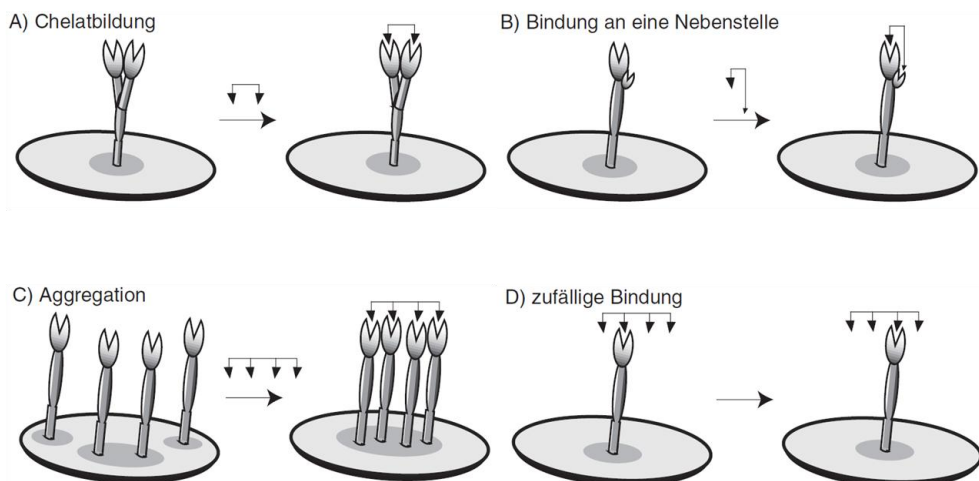


Abbildung 7: Mechanismen der Rezeptorbindung an multivalente Liganden, die zu erhöhter Bindungsaffinität führen: Chelatbindung (A), Bindung an eine Nebenstelle (B), Aggregation (C) und zufällige Bindung (D). Diese Bindungsmechanismen treten häufig auch in Kombination auf und können nicht immer strikt voneinander unterschieden werden.^[47]

Zelluläre Kommunikation beruht jedoch nicht allein auf Multivalenzeffekten. So spielen beispielsweise makromolekulare Effekte sowie die Ligandendichte und ihre konformationelle Flexibilität und Verfügbarkeit ebenfalls eine Rolle.^[49,50] Viele, möglicherweise wichtige Parameter der Glycocalyx-Biologie sind noch unverstanden.^[51] Die Suche nach neuen Funktionsprinzipien gilt es mit Hilfe von Modellsystemen, beispielsweise geeigneten Glycomimetika, voranzutreiben.

1.2 Glycomimetika

Bei der Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen der Glycocalyx werden die entsprechenden Substanzen in ausreichender Menge und Reinheit benötigt. Aufgrund der Komplexität des Systems und der hohen Mikroheterogenität der Glykokonjugate lassen sich diese nicht immer aus natürlichen Quellen extrahieren. Auch die Reproduktion auf chemischem oder enzymatischem Weg läuft nicht immer problemlos. Mit synthetischen Glycomimetika lassen sich bestimmte strukturelle und funktionelle Eigenschaften natürlicher Glycocalyx-Komponenten nachempfinden und durch leichter zugängliche und gut variierbare Strukturen ersetzen.^[52–54] Durch die Verwendung etablierter Synthesemethoden kann so eine Vielzahl unterschiedlicher Glycomimetika dargestellt werden. Ausgehend von verschiedenen Kernmolekülen können diverse Klassen von Glycomimetika synthetisiert werden (Abbildung 8).

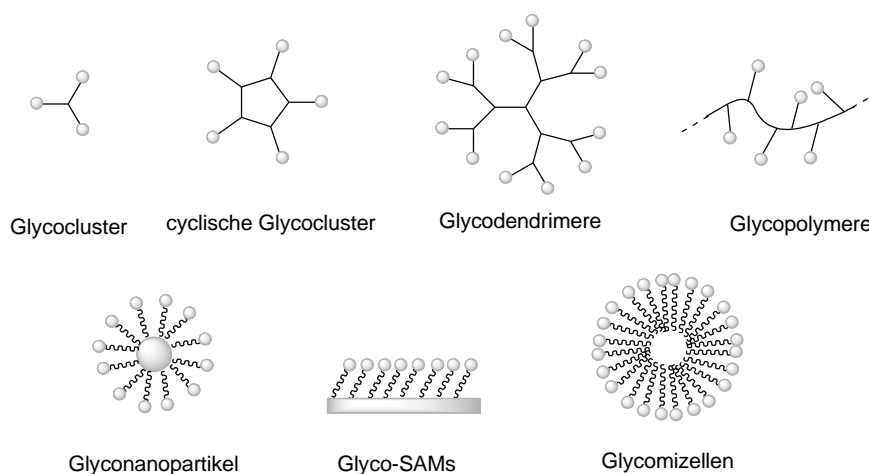


Abbildung 8: Eine Variation multivalenter Glycomimetika-Klassen: Glycocluster, Glycodendrimere, Glycopolymere, Glyconanopartikel, Glyco-SAMs und Glycomizellen.

Glycocluster nennt man alle Glycomimetika mit geringem Molekulargewicht, geringer Symmetrie, definierter Struktur und wenigen Bindungsstellen. Ebenfalls eine definierte Struktur, jedoch eine höhere Symmetrie und eine größere Anzahl an Bindungsstellen, besitzen Glycodendrimere. Bei den Glycopeptiden oder Glycopolymeren werden die Kohlenhydrateinheiten an ein Peptid- bzw. Polymerrückgrat gebunden und können so hohe Molekulargewichte erreichen. Auch Glycomizellen oder dreidimensionale Grundkörper wie Nanopartikel, die zu Glyconanopartikeln funktionalisiert werden

können, sind bekannt. Ebenso können selbstorganisierende Monoschichten mit Kohlenhydraten dekoriert werden und als Glycomimetikum fungieren.^[40,55–57]

Die Struktur von Glycomimetika kann je nach Einsatzort variiert und optimiert werden. So kann zum Beispiel ihre Affinität zum Rezeptor zielgerichtet verändert werden, so dass sie verbesserte pharmakologische Eigenschaften im Vergleich zum natürlichen Vorbild zeigen. Dabei muss nicht unbedingt eine große strukturelle Ähnlichkeit zwischen den natürlichen Vorbildern und ihren Mimetika bestehen. Um eine ähnliche biologische Wirkung zu erzielen ist vor allem eine große Funktionsverwandtschaft entscheidend. Als Beispiel seien hier die zahlreichen synthetischen Mimetika für das Trisaccharid Sialyl-Lewis^x genannt, die ebenso effektiv gegenüber den Lektinen abschnitten wie das natürliche Vorbild.^[28,58–60]

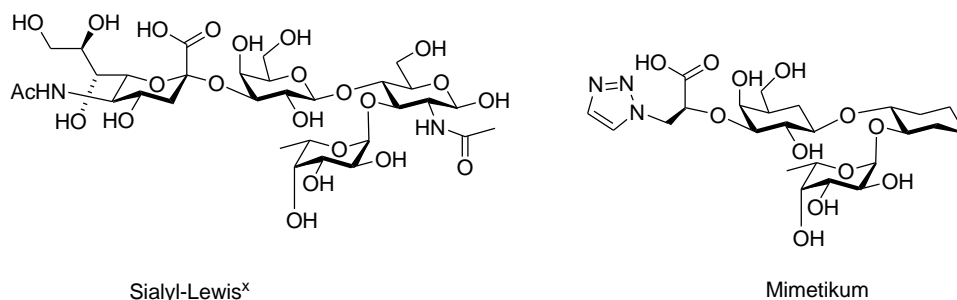


Abbildung 9: Sialyl-Lewis^x und ein für die Selektin-Bindung optimiertes Mimetikum als Beispiel für ein Glycomimetikum mit ähnlichen Ligand-Eigenschaften wie das natürliche Vorbild.^[60]

Dieses Beispiel zeigt wie nützlich und wichtig die Entwicklung und Optimierung neuer Mimetika auf Basis von Kohlenhydraten, die individuell für die jeweilige Anwendung maßgeschneidert werden können, ist. So können gezielt funktionelle Gruppen zur Untersuchung einer bestimmten Fragestellung bei der Synthese von Glycomimetika eingebaut werden. Der Einbau einer Azobenzoleinheit in das Zentrum eines Glycoclusters führte z. B. zu einem Glycomimetikum, dessen Affinität gegenüber einem Lektin geschaltet werden konnte.^[61,62] Dabei sollen sich schaltbare Glycomimetika generell für die Untersuchung konformationeller Veränderungen in der Glycobiologie eignen.

1.3 Konformationelle Kontrolle in Biosystemen

Konformationelle Kontrolle spielt in der Natur bei vielen biologischen Prozessen eine Rolle. Dabei wird von der Zelle häufig ein äußerer, chemischer oder physikalischer Reiz empfangen und weitergeleitet. Dadurch wird eine Reaktionskaskade ausgelöst an deren Ende eine spezifische biochemische Reaktion steht. Die Reize können in Form von optischen oder elektrischen Impulsen erfolgen und führen häufig zu einer konformationellen Änderung der beteiligten Proteine (Rezeptoren), die den Reiz empfangen. Diese Konformationsänderung stellt oft den ersten Schritt der eingeleiteten Ereigniskaskade dar. Ein prominentes Beispiel für eine solche Reaktionskaskade ist der Sehprozess, der auf eine lichtinduzierte Konformationsänderung in dem Rezeptor Rhodopsin zurückzuführen ist. Rhodopsin gehört zur größten Klasse integraler Membranproteine, den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Charakteristisch für diese Rezeptoren sind die sieben Transmembranhelices, die nach Aktivierung eine Konformationsänderung eingehen. Das Rezeptorprotein Rhodopsin wird durch den Einfall von Licht auf die Retina aktiviert. Das Chromophor 11-*cis*-Retinal ist in Form einer Schiff'schen Base kovalent an den Proteinteil (Opsin) des Rhodopsins gebunden und isomerisiert unter Absorption von Licht zum all-*trans*-Retinal. Dabei reicht die Absorption *eines* Photons aus, um eine *cis-trans*-Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zum all-*trans*-Retinal zu bewirken. Diese strukturelle Änderung im Chromophor ruft konformationelle Änderungen in den Transmembranhelices des Proteins hervor - der erste Schritt zur visuellen Signalübertragung.^[63–66]

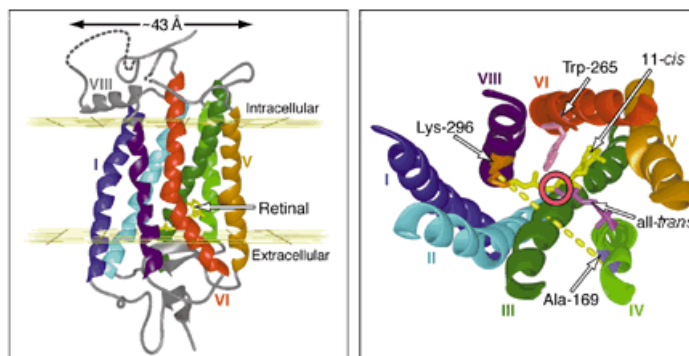


Abbildung 10: Die sieben Transmembranhelices des Rhodopsins (links). Das Chromophor Retinal befindet sich ungefähr im Zentrum der Lipiddoppelschicht und ist hier sowohl in der 11-*cis*-Form (gelb) als auch in der all-*trans*-Form (magenta) dargestellt (rechts). Einkreist ist der Punkt gezeigt, an dem die *cis-trans*-Isomerisierung stattfindet.^[63]

Neben dem Sehprozess gibt es zahlreiche weitere Beispiele konformationeller Kontrolle in der Natur. Hier sei exemplarisch die Bindung von Adrenalin oder Insulin an ihre Rezeptoren genannt, welche jeweils eine Konformationsänderung im Protein bewirken.^[13,67,68]

Zwar lassen heutzutage moderne Bildgebungsverfahren und fluoreszierende Proteine die Beobachtung von Proteinen in lebenden Zellen in Echtzeit zu,^[69] die Beobachtung des dynamischen Geschehens in der Glycocalyx war bisher jedoch noch nicht möglich. Klar ist dennoch, dass die konformationelle Dynamik der Glycocalyx das Zellgeschehen beeinflussen kann. Untersuchungen haben ergeben, dass im Zusammenhang mit Signaltransduktion die Zahl der aktivierten Rezeptoren, ihre Identität und ihr stöchiometrisches Verhältnis sowie die Umgebung, in der sie sich befinden, eine Rolle spielen. Dabei ist auch der Abstand und die relative Orientierung der Rezeptoren von Bedeutung.^[47] Neben der Konstitution und der Konfiguration von Liganden gewinnt also deren konformationelles und supramolekulares Verhalten in einer molekularen Umgebung für das „Signalling“ auf Zelloberflächen immer mehr an Bedeutung.

Stellt man sich die Kohlenhydratanteile von Glycoproteinen und Glycolipiden wie Antennen auf der Zellmembran angeordnet vor, so lässt sich die Wechselwirkung dieser Liganden mit verschiedenen Rezeptoren wie zum Beispiel Lektinen, Selektinen, Enzymen, Hormonen, Toxinen oder Antikörpern übersichtlich beschreiben. Es ist nun denkbar, dass hier bei Annäherung eines Rezeptors an den Liganden eine konformationelle oder supramolekulare Änderung der Molekülanordnung auftritt. Unklar ist dabei unter anderem, ob diese konformationelle Veränderung das ganze makromolekulare System der Glycocalyx betrifft, oder ob sie nur lokal von Bedeutung ist.

WILLNER und Mitarbeitern ist es gelungen durch Photostimulation eines entsprechenden Biomaterials die biologische Funktion von Proteinen „an- und auszuschalten“.^[70] Dies geschah durch Verwendung kovalent verknüpfter Azobenzol-Komponenten, die eine licht-induzierte *cis-trans*-Isomerisierung eingehen. Es ist also möglich die molekulare Ordnung und Ausrichtung in Biosystemen gezielt zu verändern und dadurch die biologische Funktion zu modulieren.^[70,71]

2 Projektidee

Konformationelle Kontrolle spielt in der Natur für viele biologische Prozesse eine Rolle und ist häufig der erste Schritt einer Signaltransduktionskaskade. Im Fall von Proteinrezeptoren ist die konformationelle Änderung von molekularen Interaktionspartnern ein gut untersuchtes Phänomen.^[13,63-68] Ob sie in der Glycobiologie eine vergleichbare Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt. In Bezug auf die Funktion der Glycocalyx lassen die bisherigen Erkenntnisse aktueller Forschung noch viele Fragen offen. So ist zum Beispiel nicht erforscht, inwieweit die Umgebung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes die biologische Funktion beeinflusst. Ziel dieses Projektes ist die Synthese geeigneter Glycomimetika und deren Anwendung in der Untersuchung konformationsabhängiger kohlenhydratspezifischer bakterieller Adhäsion an glycosylierte Oberflächen. Um die tatsächlichen Auswirkungen konformationeller Veränderungen innerhalb der Oberflächen auf die zelluläre Adhäsion untersuchen zu können, ist es unabdingbar, glycosylierte Oberflächen zu entwerfen, die selbst kontrollierten Konformationsänderungen unterzogen werden können.

2.1 Konzept und Stand der Forschung

2.1.1 Thymidin als Auslöser einer Konformationsänderung

Die Glycocalyx ist ein auf schwachen Wechselwirkungen beruhendes biologisches System, dessen molekulare Bestandteile konformationell mehr oder weniger flexibel sind. Eine Änderung in der Konformation könnte in diesem Fall also beispielsweise durch das Versteifen des Systems herbeigeführt werden. Im Modellsystem kann diese Konformationsänderung auf unterschiedliche Weise realisiert werden. Molekulare Schalter, mit deren Hilfe zwischen zwei Konformationen „hin und her geschaltet“ werden kann, stellen eine Möglichkeit der Untersuchung dar. Dabei stellt ein solcher Forschungsprozess bestimmte Anforderungen an einen geeigneten molekularen Schalter. Es sollte sich um einen gut untersuchten Schaltprozess handeln, der zu einer signifikanten

konformationellen Änderung führt, außerdem sind gute Biokompatibilität und Wasserlöslichkeit gefordert. Aus diesem Grund eignet sich Thymin besonders gut als molekulare Basis für eine gezielte konformationelle Änderung von Glycokonjugaten.

Thymin ist biokompatibel und wasserlöslich, und es besitzt drei funktionelle Gruppen, die zur Funktionalisierung bereit stehen und zur Synthese eines Glycomimetikums genutzt werden können. Die photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition von Thymin ist für einen der häufigsten DNA-Schäden verantwortlich und ist daher ein gut untersuchter Vorgang. Durch das im Sonnenlicht vorkommende UV-Licht wird eine Cycloaddition zwischen benachbarten Nucleobasen im DNA-Doppelstrang ausgelöst. Wird dieser Schaden nicht durch Reparaturmechanismen behoben, kann er zu einer fehlerhaften Replikation und Transkription führen.^[72,73]

Das Absorptionsmaximum von Thymin liegt bei etwa 270 nm. Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda > 290$ nm führt unter Dimerisierung zweier Thymin-Einheiten zu einer [2+2]-Cycloaddition der C=C-Doppelbindungen. Das entstehende Dimerisierungsprodukt ist das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD). Die Dimerisierung zeigt sich im Rückgang des Absorptionsmaximums und ist somit UV-spektroskopisch nachweisbar (Abbildung 11).

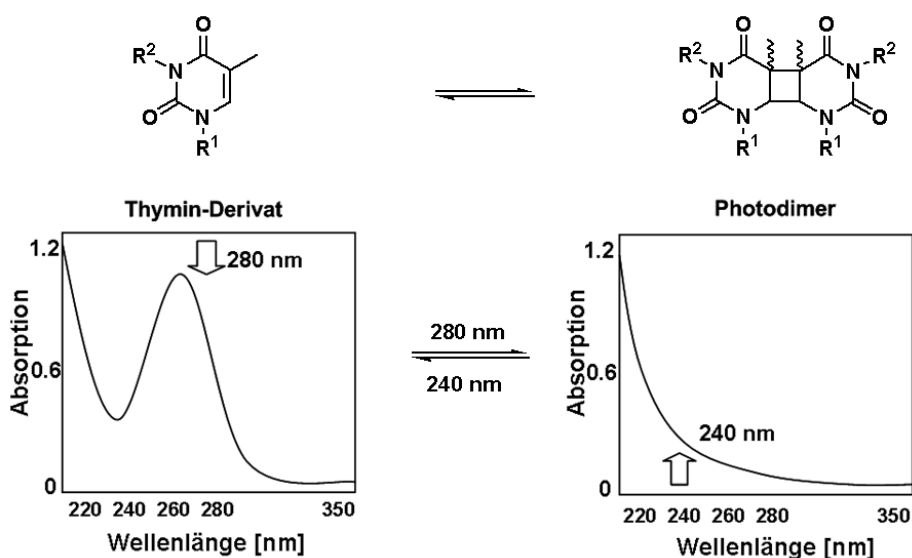


Abbildung 11: Die Photodimerisierung von Thymin ist reversibel und führt zum Rückgang des Absorptionsmaximums bei ca. 270 nm. Dadurch lässt sich die [2+2]-Cycloaddition UV-spektroskopisch verfolgen.^[74]

Liegt die Thyminverbindung in aggregierter Form vor, so wie es im DNA-Doppelstrang der Fall ist, erfolgt die Photodimerisierung überwiegend aus dem Singulettzustand. Die Dimerisierung von Thymin in Lösung erfolgt jedoch aus dem Triplettzustand. Daher wird häufig Aceton als Triplettensensitizer zugesetzt. Triplettensensitizer besitzen eine hohe Quantenausbeute beim Intersystem-Crossing und fördern so den Übergang von Thymin in den Triplettzustand.^[74]

Die Photodimerisierung von Thymin führt zur Bildung von sechs stereoisomeren *syn*- und *anti*-Produkten des CPDs, die durch [2+2]-Cycloaddition der C=C-Doppelbindung des Thymins entstehen (Abbildung 12). Die *syn*- und *anti*-Orientierung ist bedingt durch die Lage der Nucleobasen zueinander. Die *cis-trans*-Stereoisomere des Cyclobutans hingegen entstehen aufgrund der Prochiralität der Kohlenstoffatome an C5_{Thy} und C6_{Thy}. Daraus ergeben sich die sechs stereoisomeren Cyclobutanpyrimidindimere, die in Abbildung 12 gezeigt sind.

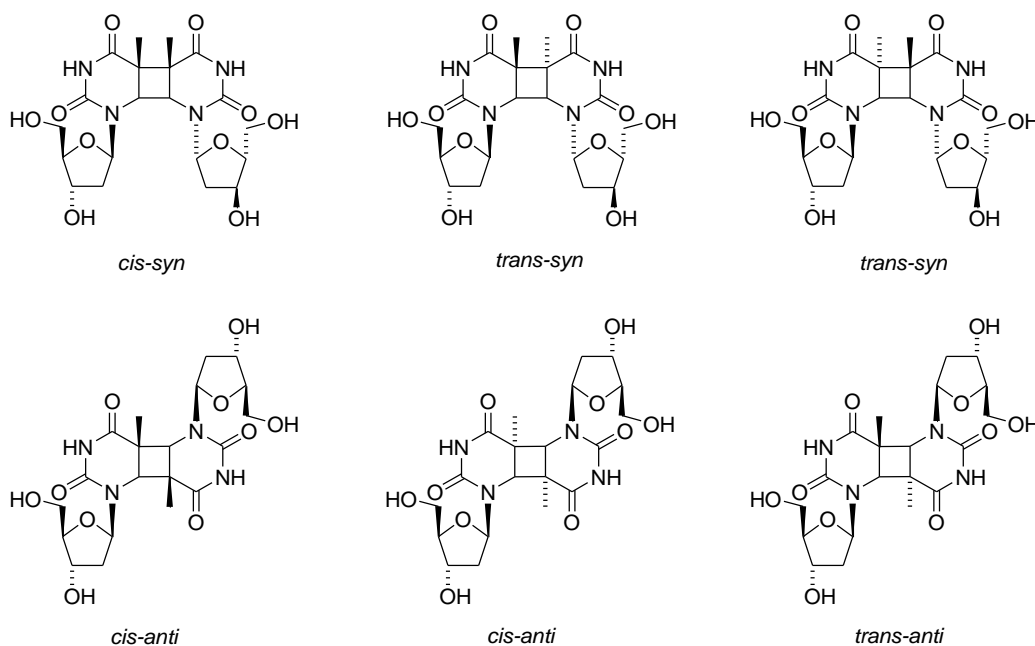


Abbildung 12: Infolge der Belichtung entstehen sechs Isomere des dimeren Cyclobutan-Cycloadditionsproduktes: ein *cis-syn*-, je zwei *trans-syn*- und *cis-anti*- sowie ein *trans-anti*-Produkt.

Im Gegensatz zur Dimerisierung von Uridin ist die von Thymin aufgrund der Repulsivität der im Dimer benachbarten Methylgruppen reversibel. Die Cycloreversion erfolgt mit energiereicher Strahlung bei einer Wellenlänge von 240 nm.^[75]

Neben den Cyclobutanpyrimidindimeren entstehen bei der Belichtung von Thymin in geringerem Maß auch (6-4)-Photoadditionsprodukte und Sporenphotoprodukte (Abbildung 13). Die (6-4)-Additionsprodukte werden in einer Paterno-Büchi-Reaktion durch Addition der C=C-Doppelbindung eines Thymins mit der C=O-Doppelbindung eines benachbarten Thymins und anschließende Ringöffnung des Oxetan-Intermediats gebildet. Durch Photolyse entsteht das Valenzisomer des (6-4)-Photoadduktes, das Dewar-Photoprodukt. Bei Sporen konnte eine 5-50mal höhere UV-Resistenz als bei entsprechenden wachsenden Zellen beobachtet werden. Es bildet sich hier ein einzigartiger Photoschaden, der Sporenphotoschaden. ^[76-86]

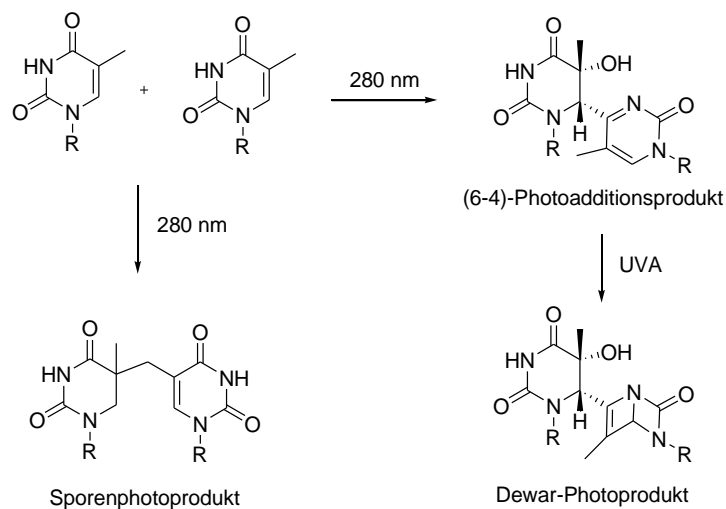


Abbildung 13: Neben den CPD können weitere Photoadditionsprodukte zwischen benachbarten Thyminen entstehen: die (6-4)-Photoadditionsprodukte und Sporenphotoprodukte. ^[76]

2.1.2 FimH: ein Lektin für die Untersuchung zellulärer Adhäsion

Für die Untersuchung konformationsabhängiger bakterieller Adhäsion an glycosylierte Oberflächen wurde ein im Arbeitskreis gut etabliertes System herangezogen: die Typ-1-Fimbrien-vermittelte bakterielle Adhäsion an α -D-mannosylierte Oberflächen. Typ-1-Fimbrien sind adhäsive Organellen der uropathogenen *Escherichia coli*-Bakterien (Abbildung 14).

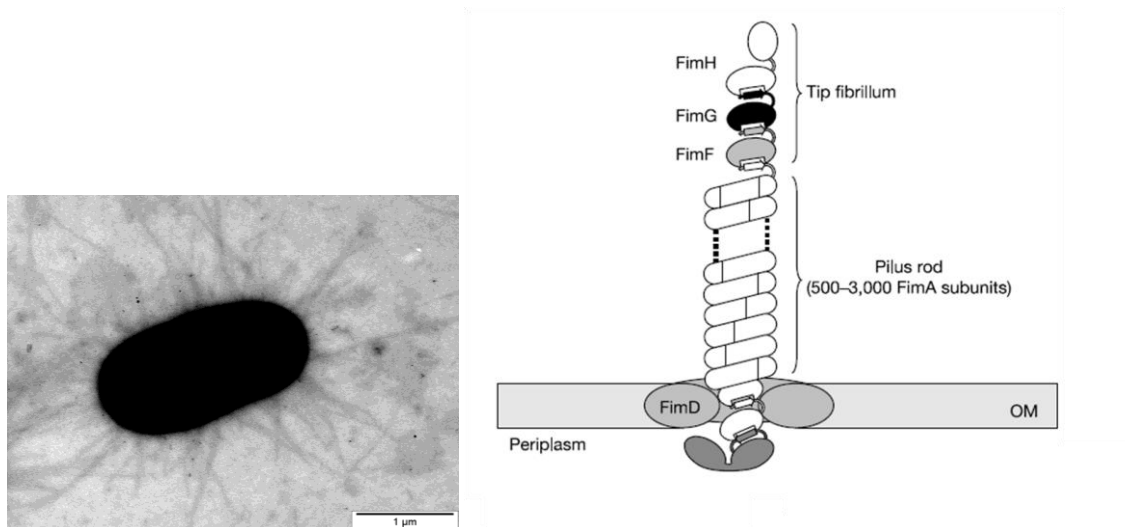


Abbildung 14: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Typ-1-fimbrierten *Escherichia coli*-Bakteriums (links)^[87] und schematische Darstellung einer Typ-1-Fimbrie, aufgebaut aus den einzelnen Fim-Proteinen (rechts).^[88]

Das für die spezifische Bindung an α -D-Mannose verantwortliche Lektin FimH befindet sich an der Spitze der Typ-1-Fimbrien. Dieses Protein ist aus zwei Domänen aufgebaut: der N-terminalen Lektindomäne, die für die spezifische Bindung der Kohlenhydrate verantwortlich ist und der C-terminalen Pilin-Domäne.^[89] Die erste Kristallstruktur von FimH wurde 1999 von KNIGHT et al. publiziert.^[90] Die Kristallisation erfolgte im Komplex mit dem Chaperone FimC und einem gebundenen Liganden in der CRD (Abbildung 15).

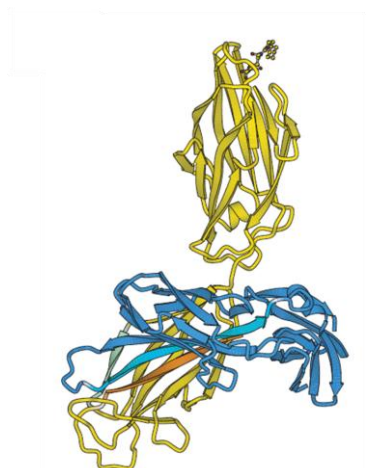


Abbildung 15: FimC-FimH-Komplex (FimH: gelb, FimC: blau), das gebundene C-HEGA-Molekül zeigt die Lage der CRD an der Spitze der Domäne an.^[90]

Inzwischen sind weitere Kristallstrukturen veröffentlicht worden,^[89,91,92] wobei alle publizierten Röntgenstrukturanalysen die Existenz einer einzigen an der Spitze des FimH-Proteins gelegenen Kohlenhydrat-erkennenden Domäne bestätigen, die für die spezifische Bindung von α -D-Mannosiden verantwortlich ist. Bei der Bindung der α -D-Mannoside in der CRD spielen sowohl entropische als auch enthalpische Effekte eine Rolle. Zum einen ist die Bindung durch die Verdrängung von sechs Wassermolekülen aus der CRD entropisch begünstigt, zum anderen wird das Mannosid durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren innerhalb der CRD komplexiert. Am Eingang der CRD befindet sich außerdem das sogenannte „Tyrosin-Tor“ (Abbildung 16). Dieses wird aus den Aminosäuren Tyr48 und Tyr137 gebildet und kann durch Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen Mannoside mit aromatischem Aglycon besonders gut binden. Mit Hilfe dieser Wechselwirkungen lassen sich die erhöhten Bindungsaffinitäten von aromatischen Liganden gegenüber nicht-aromatischen erklären.^[90,93]

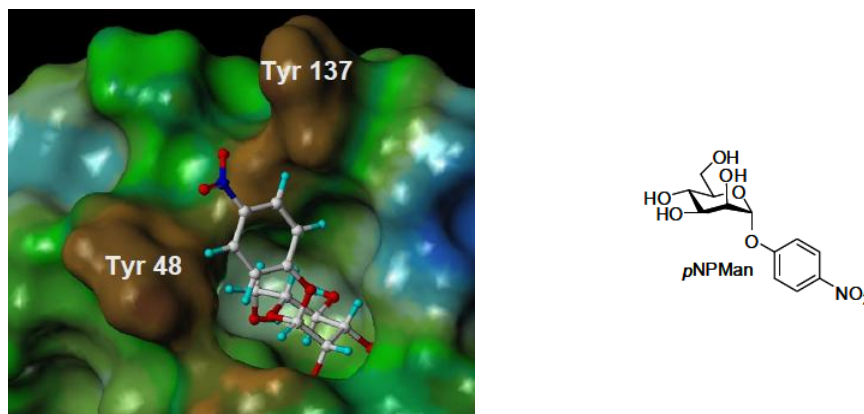


Abbildung 16: Strukturelle Details der CRD. Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten befinden sich am Eingang der CRD. Die Aminosäuren Tyr48 und Tyr137 bilden das sogenannte „Tyrosin-Tor“ außerhalb der CRD und bewirken eine besondere Interaktion mit Mannosiden mit aromatischem Aglycon, beispielsweise mit pNPMannose.^[87]

Die Bestimmung der Affinität von Mono- und Oligosacchariden gegenüber dem Lektin FimH erfolgt über klassische Hämagglutinationsassays,^[94] kompetitive ELISA^[95] oder ähnliche Inhibitionsassays. Die direkte Messung der bakteriellen Adhäsion an unterschiedlich glycosylierte Oberflächen ist ebenfalls möglich.^[96] Daher eignet sich dieses Testsystem besonders gut für die Untersuchung konformationsabhängiger bakterieller Adhäsion an photosensitive Glycoarrays.

2.1.3 Stand der Forschung

Um den Effekt einer konformationellen Änderung innerhalb einer glycosylierten Oberfläche auf die bakterielle Adhäsion zu untersuchen, wurden von K. SCHWEKENDIEK^[97] Glycothymidin-Derivate synthetisiert und in Lösung auf ihre Affinität gegenüber dem Lektin FimH getestet. Die verwendeten Verbindungen sind in Abbildung 17 dargestellt. Sie erwiesen sich alle als spezifische Liganden des Lektins FimH.

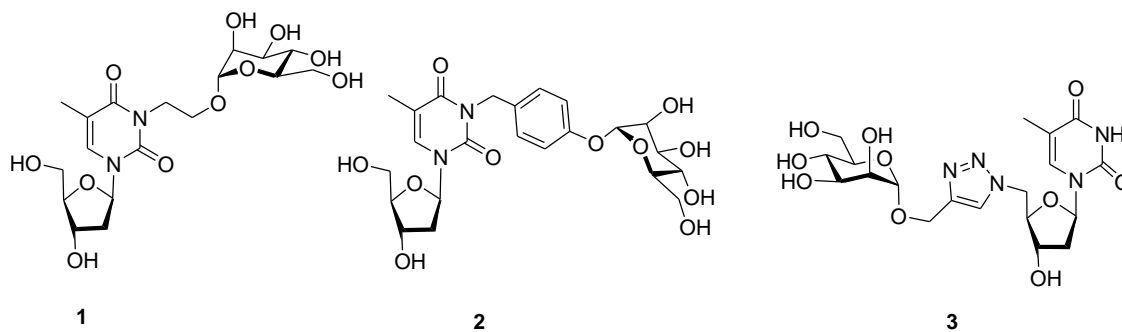


Abbildung 17: Von K. SCHWEKENDIEK dargestellte und in Lösung auf ihre Affinität zum Lektin FimH getestete Liganden.^[97]

Weiterhin wurde das in Lösung untersuchte Mannosyloxyethyl-funktionalisierte Glycothymidin-Derivat **1** für die Darstellung eines Glycoarrays auf Polystyroloberflächen ausgewählt. Für die Immobilisierung auf vorfunktionalisierten Polystyrolmikrotiterplatten wurde **1** mit einer Aminfunktion ausgestattet, über die es an die funktionelle Gruppe der Polystyroloberfläche gebunden werden konnte (Abbildung 18).

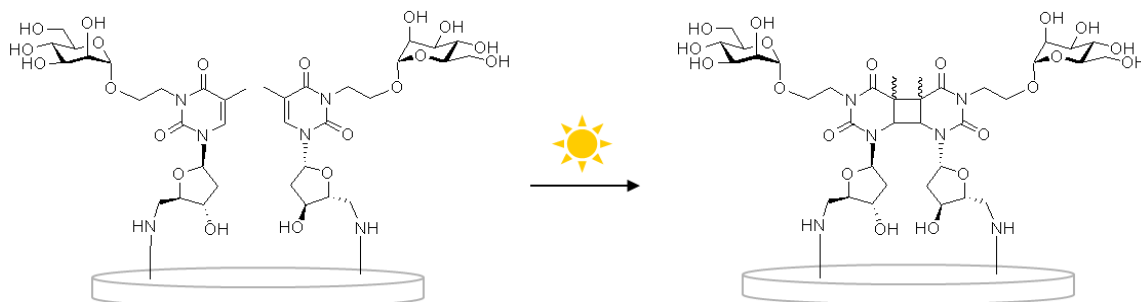


Abbildung 18: Schematisch dargestellt ist die mit Glycothymidin **1** funktionalisierte Polystyroloberfläche. Durch Bestrahlung mit Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm kommt es zu einer Cycloaddition zwischen benachbarten Thymineinheiten auf der Oberfläche.

Die konformationelle Änderung innerhalb der glycosylierten Oberflächen sollte mit Hilfe der eingebauten Thymin-Substruktur, dem photoschaltbaren Teil des Konjugates, herbeigeführt werden. Thyminidin ist aufgrund seiner Biokompatibilität und Wasserlöslichkeit für bakterielle Adhäsionsstudien besonders gut geeignet. Durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda > 295$ nm kommt es zur Ausbildung eines Cyclobutanringes zwischen je zwei Thymineinheiten (Abbildung 18). Findet diese Reaktion zwischen zwei immobilisierten Glycothymidin-Derivaten statt, führt sie zu einer Änderung der konformationellen Eigenschaften der glycosylierten Oberfläche. Erste Untersuchungen der bakteriellen Adhäsion an die dargestellten Glycothymidin-Oberflächen zeigten nach Bestrahlung der Oberfläche eine Abnahme der bakteriellen Adhäsion (Abbildung 19). Dieser Effekt lieferte erste Anzeichen für eine Abhängigkeit der Zelladhäsion von konformationellen Gegebenheiten der glycosylierten Oberfläche.

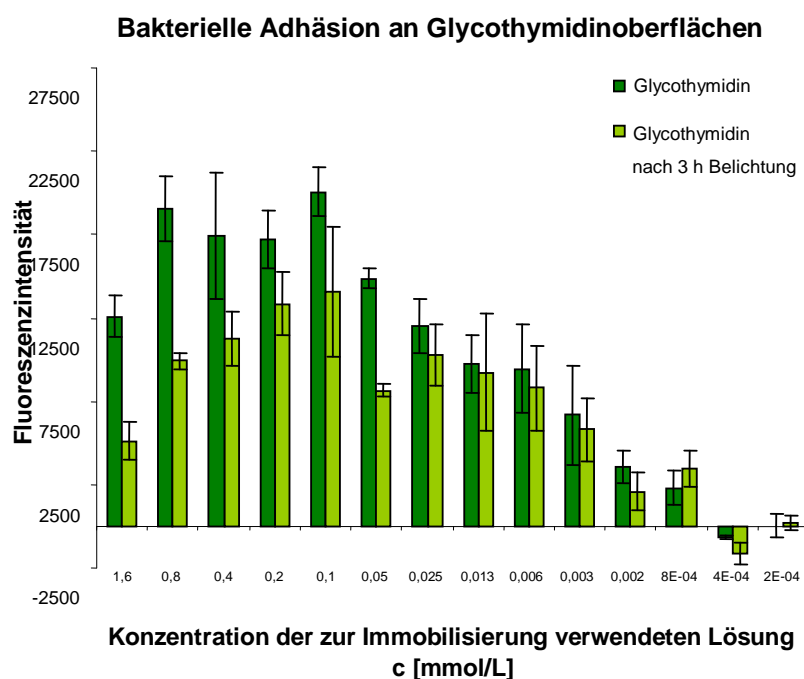


Abbildung 19: Das Aminoglycothymidin wurde auf Mikrotiterplatten immobilisiert und die bakterielle Adhäsion in Abhängigkeit der konformationellen Gegebenheiten der Oberfläche gemessen. Durch die Belichtung des Glycoarrays konnte ein signifikanter Unterschied in der bakteriellen Adhäsion hervorgerufen werden. Im Konzentrationsbereich zwischen 1.6 mmolar und 50 μ molar der Aminoglycothymidin-Lösungen, die für die Immobilisierung verwendet wurden, wurde nach Bestrahlung eine deutliche Abnahme der bakteriellen Adhäsion beobachtet.^[97]

2.2 Bisher ungelöste Fragen

Bisher geht man zwar davon aus, dass in dem verwendeten Glycoarray konformationelle Veränderungen durch die photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition der Thyminseinheiten zum Cyclobutanpyrimidindimer ausgelöst werden, dieser Reaktionsschritt auf der Oberfläche ist jedoch im Gegensatz zur Dimerisierung in Lösung nicht nachgewiesen. Um das Ergebnis der bakteriellen Adhäsionstests richtig einschätzen zu können, ist es wichtig die Dimerisierung der Thymin-Derivate auf der Oberfläche nachzuweisen. Auch ist nicht ausgeschlossen, dass die beobachtete Verminderung der bakteriellen Adhäsion mit der Zerstörung der Oberfläche durch die verwendete energiereiche Strahlung zusammenhängt. Es wurden auch Kontrollexperimente mit dem photochemisch inaktiven Monosaccharid **4** (Abbildung 20) durchgeführt. Diese lieferten allerdings ambivalente Ergebnisse (für die Diskussion der Ergebnisse siehe Abschnitt 3.1.2), so dass die Zerstörung der Oberfläche weiterhin nicht ausgeschlossen werden kann.

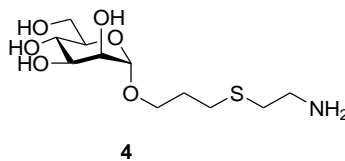


Abbildung 20: Das photochemisch stabile Mannosid **4** wurde für Kontrollexperimente auf der Polystyroloberfläche verwendet.

Von K. SCHWEKENDIEK wurden bereits diverse Versuche unternommen, die Oberfläche nach der Belichtung zu charakterisieren. Charakterisierungsversuche mit Hilfe von Infrarot- und Massenspektrometrie schlugen aber leider ebenso fehl wie die Anwendung NMR-spektroskopischer Analyse. Auch der Versuch eines spezifischen Farbstofflabelings brachte nicht den gewünschten Erfolg. Da der Nachweis der Dimerisierung auf der Oberfläche sich als nicht trivial herausstellte, wurde versucht die *N*-glycosidische Bindung chemisch zu spalten und anschließend die Spaltprodukte in Lösung zu untersuchen. Dieser Versuch gelang jedoch ebenso wenig wie die enzymatische Spaltung der Peptidbindung. An dieser Stelle blieb die Frage der Charakterisierung eines Glycothymidinarrays nach Bstrahlung also gänzlich offen.

2.3 Lösungsansätze: neue Moleküle und Methoden

Also ist das forderste Ziel der vorliegenden Arbeit die Darstellung von Glycothymidin-funktionalisierten Oberflächen, die eine Möglichkeit zur Oberflächencharakterisierung bieten. Im Vordergrund steht dabei der Nachweis der Photodimerisierung der immobilisierten Thymin-Einheiten. Dazu sollten zunächst die von K. SCHWEKENDIEK entwickelten Polystyrol-Glycoarrays so modifiziert werden, dass ihre Charakterisierung möglich wird. Zur Realisierung dieses Vorhabens sollten zum einen Glycothymidin-Derivate mit eingebauter Sollbruchstelle synthetisiert werden. Diese bieten die Möglichkeit die auf der Oberfläche photodimerisierten Glycothymidin-Derivate nach Abspaltung in Lösung zu analysieren. Zum anderen sollte das fragliche Glycothymidin-Dimer zunächst in Lösung dargestellt und anschließend immobilisiert werden. Bei diesem Ansatz wird die Bestrahlung der Polystyroloberfläche umgangen und gleichzeitig sichergestellt, dass die auf der Oberfläche immobilisierten Glycothymidin-Derivate dimerisiert sind. Da die Eigenschaften des Polystyrols störend für viele Charakterisierungsmethoden sind, wurden im weiteren Gold und Quarzglas für die Immobilisierung der Glycothymidine verwendet. Diese Materialien bieten zahlreiche Möglichkeiten der Oberflächencharakterisierung. Neben den monovalenten Glycothymidin-Derivaten sollten außerdem verschiedene divalente Derivate auf Basis der Dendrimerchemie dargestellt werden, um den Anwendungsbereich von Glycothymidinkonjugaten zu erweitern.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Glycothymidin-Arrays auf Polystyrol-Oberflächen

In der Glycobiologie ist die Glycoarray-Technik zu einem wichtigen Werkzeug für die Untersuchung von Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen geworden.^[98] Es handelt sich hierbei um ein einfaches und effizientes System, um komplexe Kohlenhydrate auf Mikrotiterplatten zu immobilisieren und ihre spezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen zu untersuchen. So können aus der natürlichen Umgebung isolierte oder synthetisch hergestellte Oligosaccharide auch in sehr geringen Mengen multivalent auf der Oberfläche präsentiert werden. Die Glycoarray-Technik erlaubt das zeitgleiche Screening hunderter Glykane auf die Spezifität und Affinität ihrer Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen.^[99–101] Dabei hat die Art wie die Glykane auf der Oberfläche immobilisiert werden Einfluss auf das Ergebnis der Assays, wie Studien multivalenter Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen zeigten.^[102] Die Glykane können nicht-kovalent, zum Beispiel als Teil eines Glycoproteins, immobilisiert oder kovalent an die Mikrotiteroberfläche gebunden werden. Für die kovalente Bindung an die Oberfläche gibt es zahlreiche Möglichkeiten. So werden beispielsweise Amin-funktionalisierte Glykane über Peptidkupplungen an die Oberfläche gebunden oder Maleimid-Thiol-Kupplungen und „Azid-Alkin-Click-Reaktionen“ zur Immobilisierung genutzt.^[99,103–106] Die von T. FEIZI entwickelte Neoglycolipid-Technologie ist ebenfalls eine Methode zur Immobilisierung von Glykanen. Hierbei werden Oligosaccharide über reduktive Aminierung mit Amin-funktionalisierten Lipiden verknüpft. Diese Glycokonjugate können dann über hydrophobe Wechselwirkungen der langen Alkylketten an die Oberfläche gebunden werden.^[107]

Von K. SCHWEKENDIEK wurden Glycothymidin-Arrays über kovalente Bindung der Amin-funktionalisierten Glycothymidine an vorfunktionalisierte Polystyrol-Mikrotiterplatten dargestellt. Diese Oberflächen wurden mit einer Wellenlänge von

$\lambda > 295 \text{ nm}$ bestrahlt um die photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition der Thymin-Substrukturen und damit eine gezielte Änderung im Glycoarray zu induzieren. Für die Untersuchung zellulärer Adhäsion in Abhängigkeit vom Zustand des Glycoarrays wurden die durch Cycloaddition veränderten Glycothymidin-Oberflächen in bakteriellen Adhäsionsstudien mit unveränderten Oberflächen verglichen. Dazu wurden beide Arten von Oberflächen parallel mit Typ-1-fimbrierten Bakterien inkubiert. Erste Experimente auf diesem Gebiet zeigten nach Bestrahlung eine Abnahme bakterieller Adhäsion an die Glycothymidin-funktionalisierte Oberfläche. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme einer Abhängigkeit der bakteriellen Adhäsion von den konformationellen Gegebenheiten im Glycoarray. Um die bisher erhaltenen Ergebnisse richtig interpretieren zu können, ist es jedoch maßgeblich, die molekulare Konstellation auf der Oberfläche des Glycoarrays nach der Belichtung zu kennen. Es ist essentiell zu wissen, ob die Belichtung tatsächlich zur gewünschten Dimerisierung der Thymin-Einheiten auf der Oberfläche geführt hat. Ferner muss ausgeschlossen werden, dass neben der Dimerisierung weitere Veränderungen oder gar teilweise Zerstörung der Polystyroloberfläche stattgefunden haben. Eine direkte Analyse der Glycothymidin-funktionalisierten Mikrotiterplatte ist aufgrund der geringen Konzentration der Liganden und der störenden Eigenschaften des Polystyrols gegenüber vielen Analysemethoden nicht trivial. Die Tatsache, dass die Zusammensetzung des Linkers und der aktivierten Gruppe der vorfunktionalisierten Mikrotiterplatten von der Firma Nunc nicht bekannt gegeben werden, erschwert die genaue Charakterisierung zusätzlich. Es wurden zahlreiche Versuche zur Analyse der glycosylierten Oberflächen vorgenommen. Weder die direkte Charakterisierung der Oberfläche mittels Infrarot- oder massenspektrometrischer Oberflächenanalytik noch die chemische oder enzymatische Spaltung einer Bindung und anschließende Charakterisierung der Spaltprodukte in Lösung brachten in der Vorläuferarbeit den gewünschten Erfolg.^[97]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere Ansätze verfolgt, um den Nachweis der photoinduzierten [2+2]-Cycloaddition der Thymineinheiten auf der Polystyroloberfläche zu erbringen. Zum einen wurden Glycothymidin-Derivate mit eingebauter Sollbruchstelle dargestellt und immobilisiert (Abbildung 21). Durch die Nutzung entsprechender Reaktionsbedingungen sollte eine selektive Bindungsspaltung und anschließende Charakterisierung der Spaltprodukte in Lösung möglich sein. Dadurch wird das Problem, welches durch die störenden Eigenschaften des Polystyrols bei der Charakterisierung der

Oberfläche auftritt, umgangen. Die Sollbruchstelle sollte mit Hilfe einer Estergruppe, die unter basischen Bedingungen gespalten werden kann, dargestellt werden.

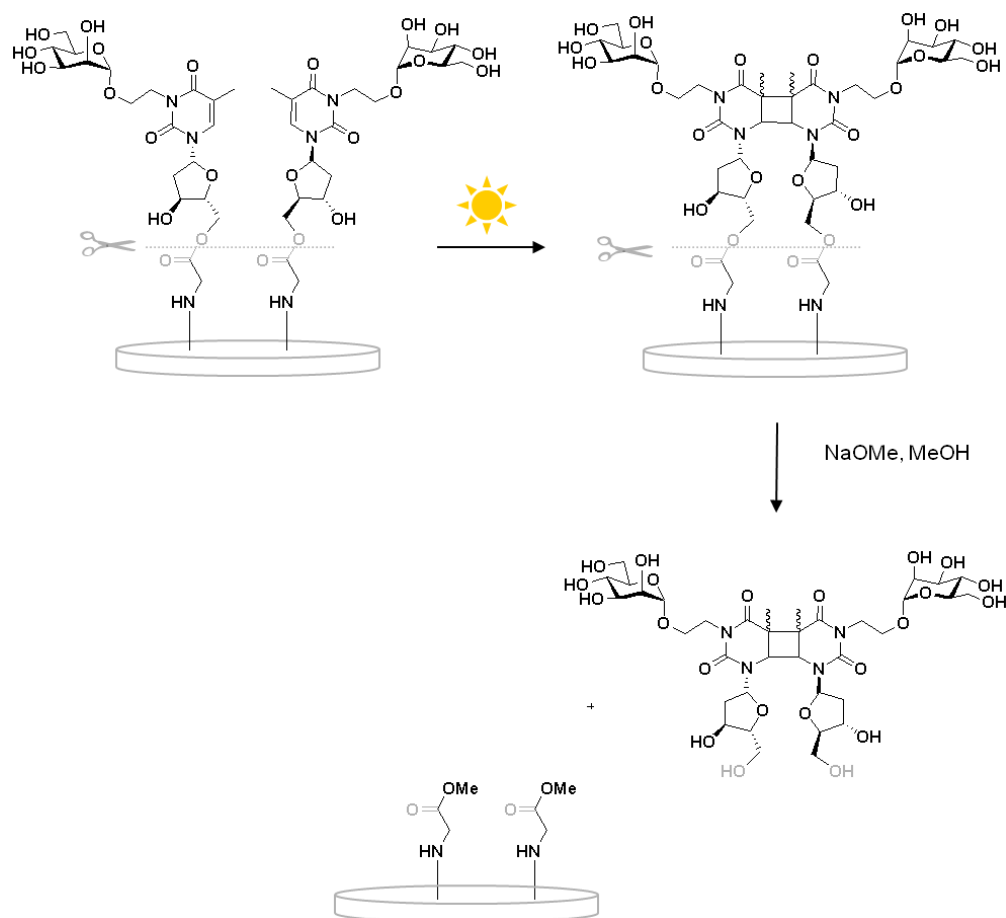


Abbildung 21: Darstellung von Glycothymidin-Arrays auf Polystyroloberflächen mit eingebauter Ester-Verknüpfung als Sollbruchstelle. Die Estergruppe kann unter basischen Bedingungen gespalten werden. Dieses Konzept erlaubt die Charakterisierung der von der Oberfläche gespaltenen Belichtungsprodukte in Lösung.

Zum anderen wurde der Ansatz der direkten Immobilisierung des zuvor in Lösung erhaltenen Dimerisierungsproduktes verfolgt (Abbildung 22). Das Glycothymidin-Derivat wurde in Lösung dimerisiert und anschließend isoliert und charakterisiert. Dadurch sind die Zusammensetzung der Moleküle auf der Oberfläche und der Dimerisierungsgrad genauestens bekannt. Dieses Konzept birgt ferner den Vorteil, dass die Polystyroloberfläche keiner Bestrahlung ausgesetzt werden muss. Eine eventuelle Zerstörung der Oberfläche durch die energiereiche Strahlung wird also von vornherein ausgeschlossen. Während vorher eine Hälfte der funktionalisierten Platte bestrahlt und mit der unbestrahlten Hälfte verglichen wurde, soll jetzt die Dimer-funktionalisierte Oberfläche mit der Monomer-funktionalisierten verglichen werden.

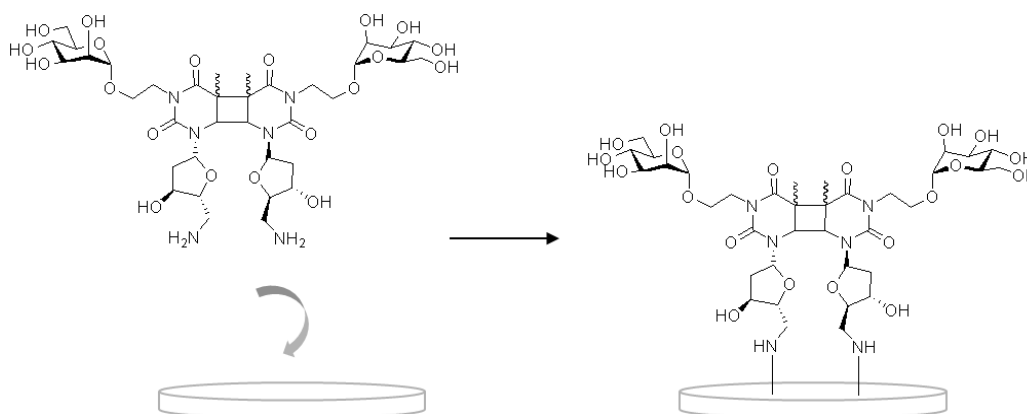


Abbildung 22: Die Methode der direkten Immobilisierung des in Lösung erhaltenen Glycothymidin-Dimers hat den Vorteil, dass die Polystyroloberfläche keiner Strahlung ausgesetzt wird. Außerdem ist auf diese Weise der Dimerisierungsgrad auf der Oberfläche genau bekannt.

3.1.1 Synthese und Anwendung Ester-gebundener Glycothymidin-Derivate

Für die Darstellung von Glycothymidin-funktionalisierten Oberflächen mit Sollbruchstelle wurden Ester-funktionalisierte Glycothymidin-Derivate synthetisiert und auf Polystyroloberflächen immobilisiert. Unter basischen Bedingungen lässt sich die Estergruppe spalten. So kann nach Belichtung auf der Oberfläche das dimerisierte Glycothymidin-Derivat abgespalten und in Lösung charakterisiert werden. Um das Konzept zu prüfen wurde zunächst das leichter zugängliche nicht-glycosylierte Thymidin-Derivat **10** dargestellt und auf Polystyrol-Mikrotiterplatten immobilisiert. Für eine selektive Funktionalisierung der 5'-Position wurden ausgehend von 2'-Desoxythymidin (**5**) beide Hydroxygruppen der Ribose mit TBDMS-Chlorid geschützt und das disilylierte Produkt **6**^[108] mit 96 % Ausbeute erhalten. Die selektive Entschützung der 5'-Hydroxygruppe wurde mit Essigsäure in einem THF-Wasser-Gemisch^[109] erreicht und das Thymidin-Derivat **7** mit freier 5'-Hydroxygruppe in moderaten Ausbeuten erhalten. Der Versuch der selektiven Entschützung mit einem TFA-Wasser-Gemisch (10:1)^[108] hingegen führte zum vollständig entschützten 2'-Desoxythymidin (**5**). Zur Bildung der Estergruppe wurde **7** unter Zusatz von DCC und DMAP an der 5'-Position mit Boc-geschütztem Glycin verestert. Das Ester-funktionalisierte Thymidin-Derivat **8** wurde mit einer Ausbeute von 77 % erhalten.

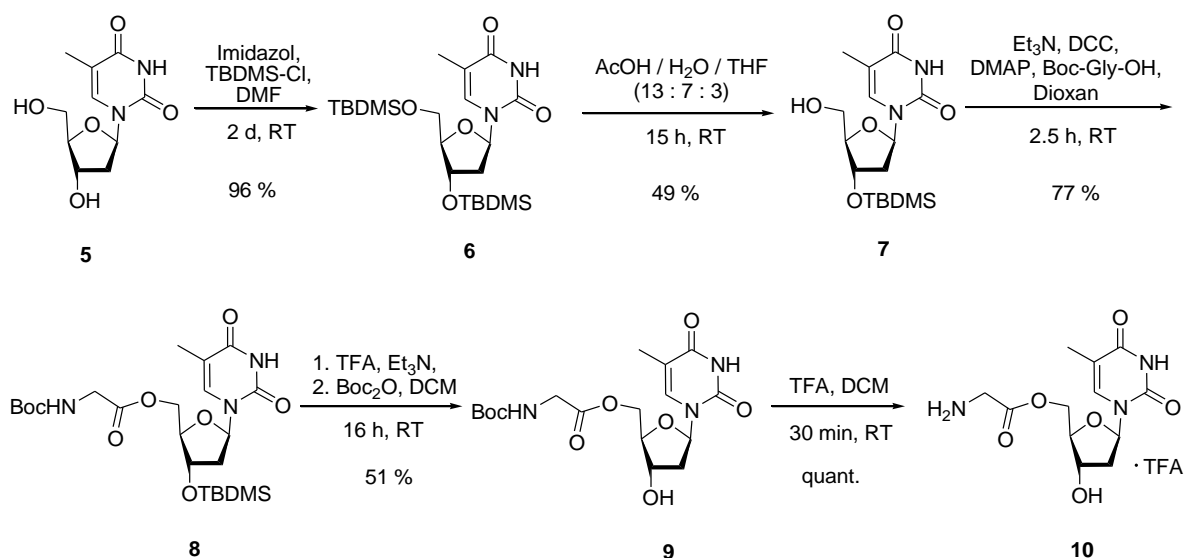


Abbildung 23: Synthese des Esters 10 in 5 Stufen ausgehend von 2'-Desoxythymidin (5).

Silylether werden üblicherweise durch Reaktion mit Fluorid-Ionen gespalten. Da diese jedoch basisch sind, eignen sie sich nicht für die Entschützung des basenlabilen Esters **8**. Daher wurde in diesem Fall eine Spaltung des Silylethers an 3'-Position durch Zugabe von Salzsäure erreicht. Dies führte jedoch teilweise auch zur Spaltung des Carbamates. Um die Aufreinigung des Produktes mittels Säulenchromatographie zu erleichtern, wurde deshalb nach Neutralisation der Reaktionslösung *in situ* eine erneute Boc-Schützung durchgeführt. Das Boc-geschützte Amin **9** wurde in relativ geringen Ausbeuten von 38 % erhalten. Eine Steigerung der Ausbeute auf 51 % konnte nach Verwendung von Trifluoressigsäure anstelle von Salzsäure erreicht werden. Auch unter diesen Bedingungen kam es teilweise zur Carbamat-Spaltung, so dass auch hier nach Neutralisation eine erneute Boc-Schützung *in situ* erfolgte. Im letzten Schritt wurde das Amin unter sauren Bedingungen entschützt. Das Ester-funktionalisierte Amin **10** wurde in quantitativer Ausbeute als Trifluoressigsäure erhalten (Abbildung 23) und konnte ohne weitere Aufreinigung für die Immobilisierung verwendet werden.

Die Darstellung des Glycothymidin-Analogons von **10** wurde unter den Bedingungen einer Williamson-Ethersynthese mit dem Bromethylmannosid **11** realisiert. Da der Ester **10** den basischen Bedingungen einer Williamson-Ethersynthese nicht standhalten würde, wurde die Kohlenhydrat-Funktionalität bereits vor der Veresterung eingeführt (Abbildung 24).

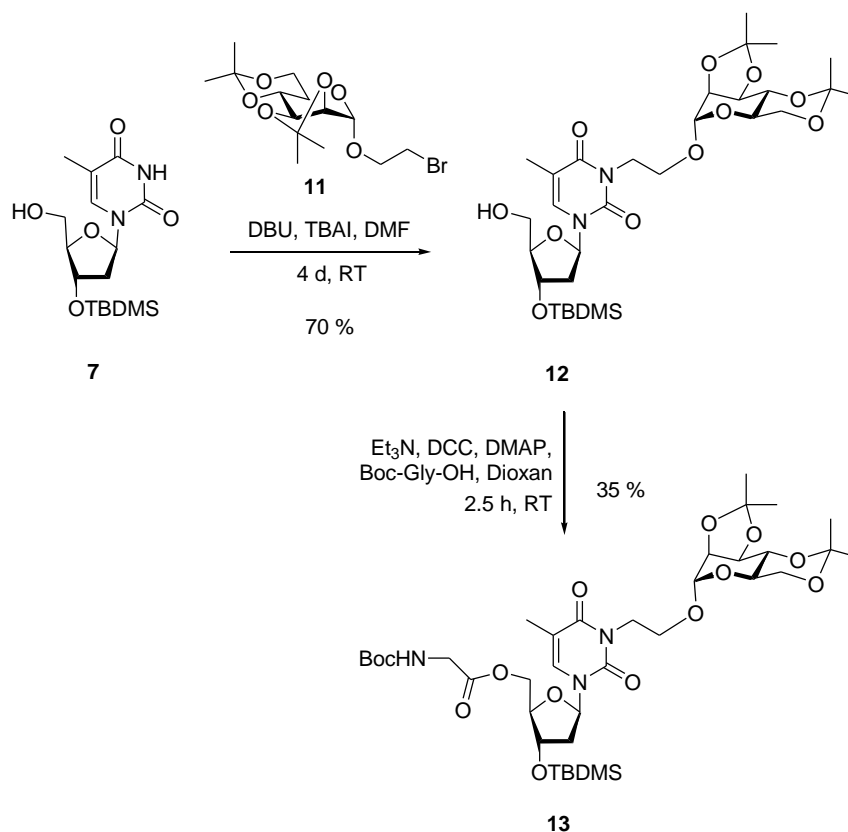


Abbildung 24: Darstellung des Glycothymidin-Esters **13** ausgehend von 3'-TBDMS-geschütztem Thymidin **7**. Veretherung mit Mannosid **11** und anschließende Veresterung mit Boc-Glycin führen zu **13**.

Dazu wurde das 3'-silylierte Thymidin-Derivat **7** mit dem Bromethylmannosid **11** unter basischen Bedingungen in 70 %iger Ausbeute zum Glycothymidin **12** umgesetzt. Anschließende Veresterung mit Boc-geschütztem Glycin führte in (noch nicht optimierten) Ausbeuten von 35 % zum Glycothymidin-Ester **13**.

Zur Prüfung der Abspaltbarkeit von Oberflächen per Sollbruchstelle wurde für die weiteren Untersuchungen zunächst der nicht-glycosylierte Ester **10** verwendet. Die Immobilisierung von Aminen auf funktionalisierten Mikrotiterplatten wird üblicherweise in Carbonatpuffer bei einem pH-Wert von 9.6 mit einer Inkubationszeit von 16 h durchgeführt. Aufgrund der Instabilität des Esters **10** im basischen Milieu mussten in diesem Fall die Immobilisierungsbedingungen angepasst werden. Dünnschichtchromatographische Verfolgung der Esterspaltung in Carbonatpuffer ermöglichte durch Vergleich verschiedener pH-Werte die Ermittlung der idealen Immobilisierungsbedingungen für den Ester **10**. Dementsprechend musste die Immobilisierung des Esters **10** bei einem pH-Wert von 7.8 und einer Inkubationszeit von maximal 2 h erfolgen.

Längere Inkubationszeiten führten wiederum zur Esterspaltung. Für die Darstellung der Ester-verknüpften Thymidin-Arrays wurden sogenannte 96-Well-Immobilizer-Aminomikrotiterplatten der Firma Thermo Scientific Nunc verwendet. Diese Polystyrol-Mikrotiterplatten sind vom Hersteller vorfunktionalisiert, so dass Amine oder andere starke Nukleophile ohne weitere Aktivierung mit der funktionellen Gruppe reagieren und so auf der Oberfläche immobilisiert werden können. Zur Immobilisierung wurde eine 10 mM Lösung des Esters **10** in Carbonatpuffer (pH = 7.8) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 2 h und abschließendem Waschen wurde der erhaltene Thymidinarray unter ZEMPLÉN-Bedingungen^[110] mit Natriummethanolat behandelt. Aus der methanolischen Lösung im Überstand der Wells konnte nach dieser Esterspaltung wie gewünscht Thymidin als Spaltprodukt massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 25).

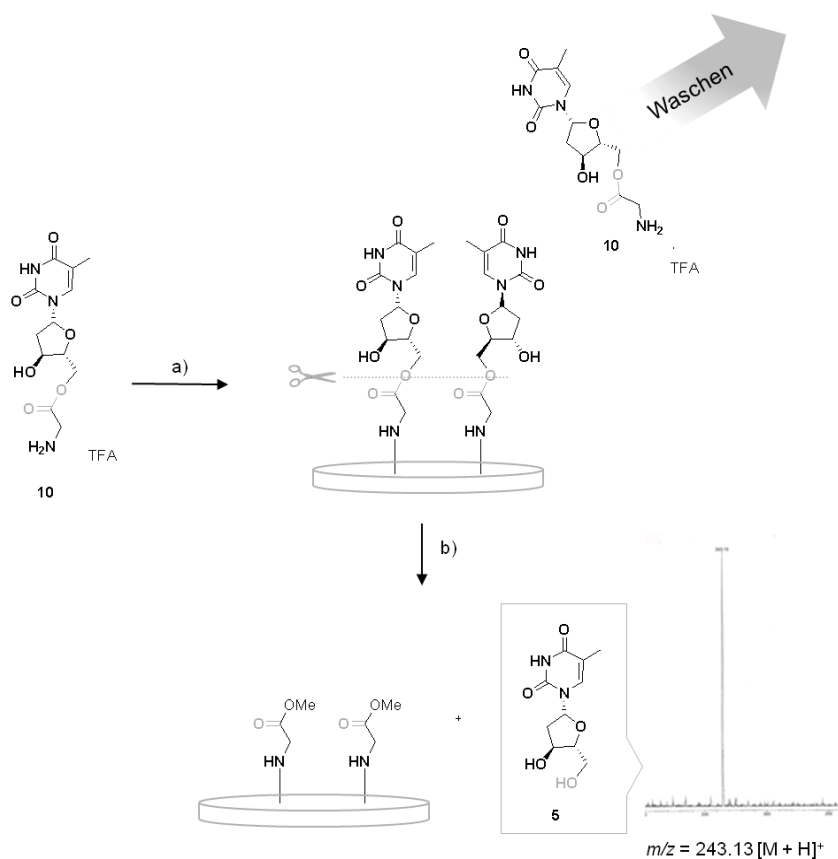


Abbildung 25: Das Glycodymidin-Derivat **10** wurde durch kovalente Bindung auf Polystyrolmikrotiterplatten immobilisiert. Zum Nachweis der Immobilisierung wurde die Verbindung **10** durch Esterspaltung von der Mikrotiterplatte abgespalten und das Spaltprodukt **4** massenspektrometrisch in der Lösung detektiert. a) Die vorfunktionalisierte Mikrotiterplatte wurde mit einer Lösung von **10** in Carbonatpuffer (pH = 7.8) 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. b) Nach einem Waschschriff wurde das Thymidin **5** durch Esterspaltung mit Natriummethanolat in Methanol von der Oberfläche abgespalten.

Der Einbau der Sollbruchstelle in die Glycothymidin-Derivate sowie die Spaltung der Moleküle von der Oberfläche konnten erfolgreich durchgeführt werden. Auch die massenspektrometrische Charakterisierung der Spaltprodukte in Lösung war möglich. Das Konzept des Einbaus einer Sollbruchstelle in Molekül-Arrays erwies sich damit als erfolgsversprechend im Hinblick auf den Nachweis der photoinduzierten [2+2]-Cycloaddition auf der Oberfläche.

Die Photodimerisierung des Esters wurde zunächst in Lösung getestet. Dazu wurden sowohl das Boc-geschützte Derivat **9** als auch der ungeschützte Ester **10** für 6 h mit einer Quecksilber-Mitteldrucklampe bei Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm bestrahlt. Das geschützte Derivat **9** reagierte mit einer Ausbeute von 93 % zum Dimerisierungsprodukt **14**. Beim ungeschützten Ester **10** hingegen wurde ausschließlich das 2'-Desoxythymidin-Dimer **16**, nicht jedoch das Dimer des Esters **15** gefunden (Abbildung 26).

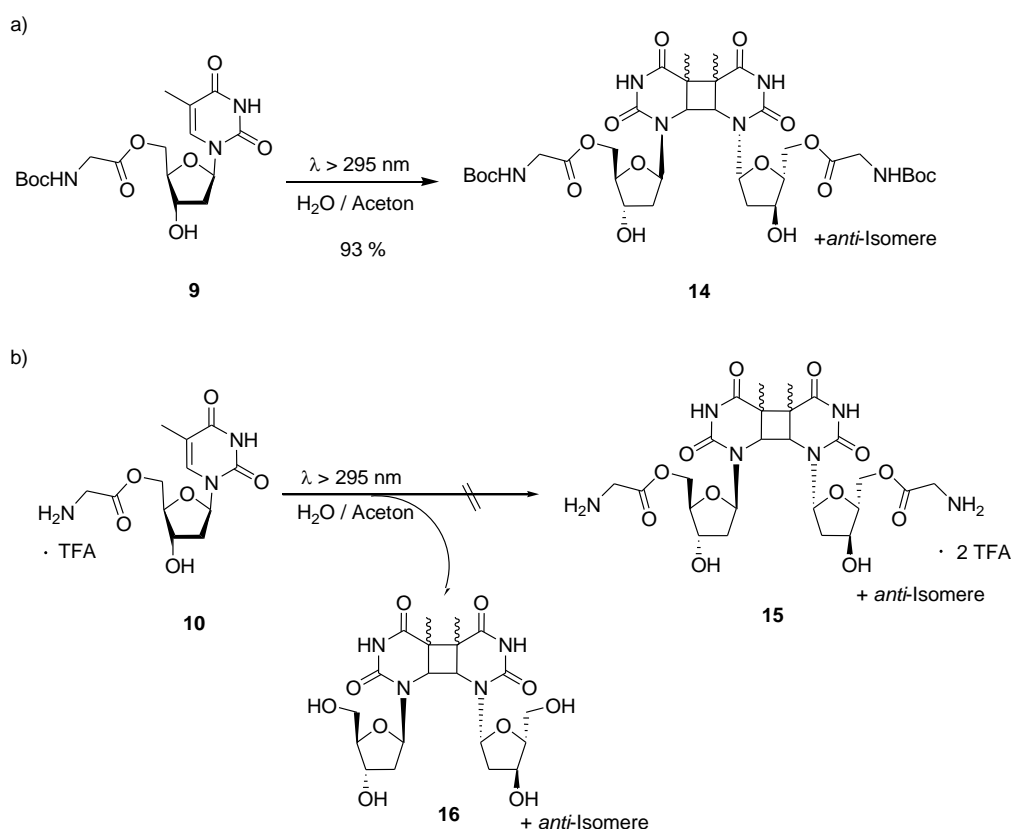


Abbildung 26: Durch photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition des Boc-geschützten Esters **9** konnte das Dimer **14** in 93 % Ausbeute erhalten werden (a). Die Instabilität des Esters **10** führt bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda > 295$ nm zum Spaltprodukt **16**. Das Dimer des Esters kann auf diesem Wege nicht erhalten werden (b).

Es erfolgt also bereits während der Belichtung eine Esterspaltung. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der ungeschützte Ester **10** auch bei einer Lagerung bei 4°C nicht länger als zwei Wochen stabil bleibt. Daher wurden die Esterverbindungen nach der Entschützung nicht lange gelagert, sondern direkt weiter umgesetzt.

Für den Nachweis der Photodimerisierung auf der Oberfläche wurde nun die Verbindung **10** auf die Polystyrolmikrotiterplatte immobilisiert und die Platte in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und so vor Lichteinwirkung geschützt, gleichzeitig wurde die andere Hälfte 3 h mit einer Quecksilber-Mitteldrucklampe bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm belichtet (Abbildung 27). Während die Dimerisierung in Lösung aus dem Triplettzustand erfolgt und aufgrund des sehr langsamen Intersystem-Crossings ein Triplettensensitizer erforderlich ist, findet laut Literatur^[74] und späteren Experimenten auf Glasoberflächen (Abschnitt 3.3) die Dimerisierung von Thymidin in immobilisierter Form aus dem Singulettzustand statt, so dass auf den Sensitizer verzichtet werden kann.

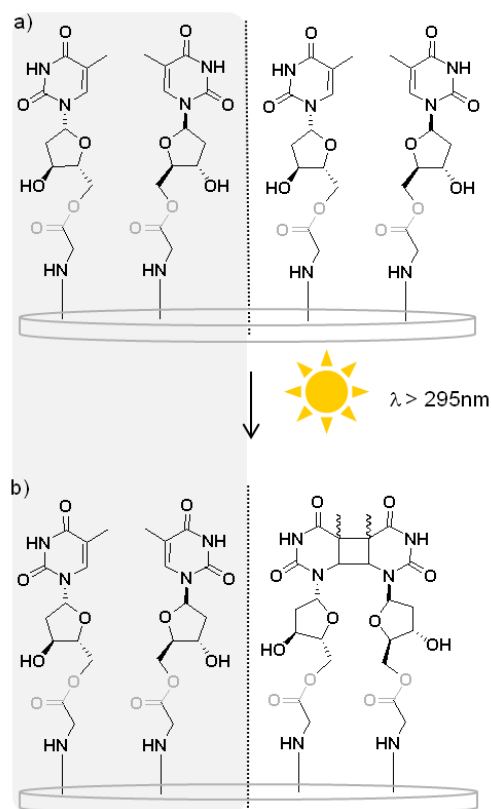


Abbildung 27: Die Thymidin-beschichtete Mikrotiterplatte wurde in zwei Hälften geteilt: eine Hälfte wurde mit einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm belichtet, während die andere Hälfte vor Lichteinwirkung geschützt wurde (grau hinterlegte Fläche).

Nach der Belichtung wurden beide Hälften gleichermaßen zunächst gewaschen und anschließend einer Esterspaltung mit Natriummethanolat in Methanol unterzogen. Unerwarteter Weise konnte in beiden Fällen nur die Masse des 2'-Desoxythymidins (**5**), nicht aber die des Dimerisierungsproduktes nachgewiesen werden. Daraus kann gefolgert werden, dass infolge der Belichtung keine Dimerisierung stattgefunden hat. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte eine geringe Belegungsdichte auf der Polystyroloberfläche sein. Diese ist vor allem durch die Vorfunktionalisierung der Mikrotiterplatte vorgegeben. Ist die räumliche Entfernung der Thymin-Einheiten zueinander zu groß, kann es nicht zur Cycloaddition kommen. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass es infolge der Belichtung zu Esterspaltung kam. Eine Vorzeitige Spaltung der Moleküle von der Oberfläche würde ebenfalls zu einer geringeren Belegung führen und erklären, warum nur monomere Spaltprodukte gefunden wurden. Aufgrund der allgemeinen Instabilität der Verbindung **10** wurde darauf verzichtet die Belegungsdichte zu testen.

ZUSAMMENFASSUNG: SYNTHESE UND ANWENDUNG ESTER-GEBUNDENER GLYCOTHYMIDIN-DERIVATE

Ester-gebundene Thymidin- und Glycothymidin-Derivate konnten dargestellt und auf Polystyrol-Mikrotiterplatten immobilisiert werden. Die Abspaltung der Moleküle von der Oberfläche an der sogenannten Sollbruchstelle konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt und die Spaltprodukte massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Konzept der Glycothymidin-Derivate mit eingebauter Sollbruchstelle prinzipiell für die Charakterisierung einer funktionalisierten Oberfläche genutzt werden kann. Die photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition auf Polystyroloberflächen konnte mit dieser Methode jedoch nicht nachgewiesen werden.

3.1.2 Direkte Immobilisierung des Aminoglycothymidin-Dimers

In der Arbeit von K. SCHWEKENDIEK wurde das Aminoglycothymidin-Monomer **22** auf der Polystyroloberfläche immobilisiert. Die Hälfte der mit dem Monomer funktionalisierten Oberfläche wurde einer Bestrahlung mit Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm ausgesetzt um das immobilisierte Monomer auf der Oberfläche zu dimerisieren und so eine konformationelle Veränderung herbeizuführen. Adhäsionstests mit dem bakteriellen Lektin FimH zeigten eine verminderte Adhäsion an die belichtete Hälfte der Oberfläche im Vergleich zur unbelichteten Hälfte. Der Nachweis der tatsächlichen Dimerisierung auf der Oberfläche konnte bisher allerdings nicht erbracht werden. Um eine Aussage über den Effekt der Dimerisierung auf die zelluläre Adhäsion an den Glycoarray sicher treffen zu können, ist es jedoch unerlässlich, die genauen molekularen Zusammenhänge auf der Oberfläche zu kennen. Da bisher infolge der Belichtung weder die Dimerisierung der immobilisierten Thymineinheiten auf der Oberfläche der Polystyrolmikrotiterplatte nachgewiesen noch eine Veränderung oder gar Zerstörung der Oberfläche durch die energiereiche Strahlung ausgeschlossen werden konnte, sollte nun dazu übergegangen werden, die Moleküle vor der Immobilisierung in Lösung zu dimerisieren und anschließend die isolierten Dimere an die Oberfläche zu binden. Da die Polystyrolplatten bei dieser Methode keiner Bestrahlung ausgesetzt werden, können auf diese Weise Veränderungen der Polystyroloberfläche infolge der Belichtung ausgeschlossen werden. Gleichzeitig wird sichergestellt, dass die auf der Oberfläche immobilisierten Moleküle tatsächlich und vollständig dimerisiert sind.

Während von K. SCHWEKENDIEK das Aminoglycothymidin-Monomer **22** auf die Polystyroloberfläche immobilisiert und anschließend auf der Oberfläche bestrahlt wurde, soll hier also das Monomer im Vorfeld in Lösung dimerisiert werden und das isolierte Dimer immobilisiert werden. Die Darstellung des Aminoglycothymidin-Monomers **22** erfolgte nach dem von K. SCHWEKENDIEK publizierten Syntheseweg.^[97] Ausgehend von 2'-Desoxythymidin (**5**) wurde in einer APPEL-analogen Reaktion unter Zusatz von Natriumazid das 5'-Azidothymidin **17** in Ausbeuten von 77 % dargestellt (Abbildung 28).^[111] Die Reaktion mit dem Mannosid **18** erfolgte dann mit einer Ausbeute von 71 % über eine Williamson-Ethersynthese.^[112] Das erhaltene Konjugat **19** lieferte nach Entschützung unter ZEMPLÉN-Bedingungen das Glycothymidin **20** in quantitativer Ausbeute.^[113] Bei der Reduktion des Azids **20** zum Amin **22** wurde *in situ* eine

Boc-Schutzung vorgenommen, da die direkte Reduktion des Azids **20** zu einem untrennbaren Produktgemisch führte. Das Boc-geschützte Amin **21** wurde in 83 % Ausbeute erhalten. Saure Spaltung der Carbamat-Schutzgruppe lieferte das Amin **22** als Trifluoroacetat in quantitativer Ausbeute. Das Amin **22** konnte wie schon früher berichtet^[97] ohne weitere Aufreinigung für die Immobilisierung auf Polystyroloberflächen verwendet werden.

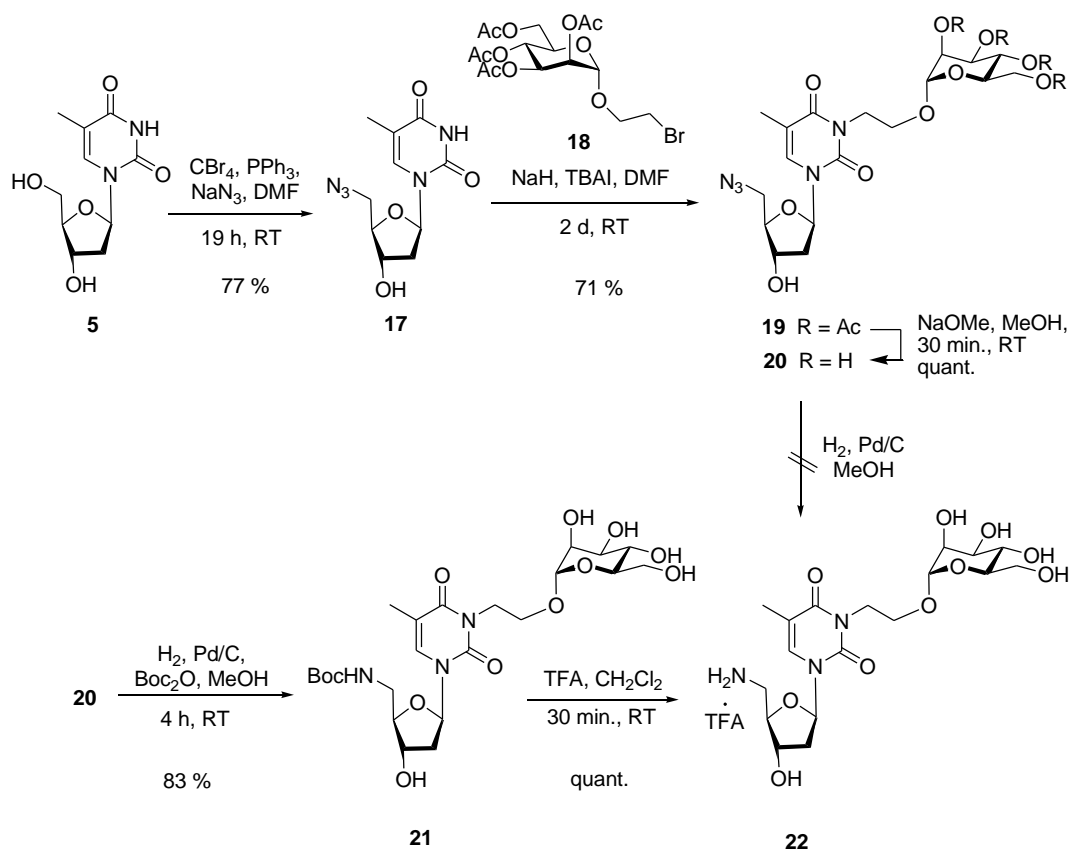


Abbildung 28: Synthese des zur Immobilisierung verwendeten Aminoglycothymidins **22** ausgehend vom 2'-Desoxythymidin (**5**) in 5 Stufen.

Für die Darstellung des Aminoglycothymidin-Dimers **24** wurde zunächst das Boc-geschützte Amin **21** verwendet (Abbildung 29). Da die Dimerisierung in Lösung aus dem Tripletzustand erfolgt, wurde die Belichtung in Wasser mit Aceton als Triplettensensitizer durchgeführt. Nach dreistündiger Bestrahlung bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm konnte das Di-Boc-geschützte Dimerisierungsprodukt **23** nach dreimaliger Gelpermeationschromatographie (Sephadex LH-20, Eluent: H_2O) in 36 % Ausbeute als Isomerenmisch isoliert werden. Die geringe Ausbeute ist auf die teilweise erfolgte Abspaltung der Boc-Schutzgruppe während der Reinigung zurückzuführen. Die

Boc-Entschützung unter sauren Bedingungen mit Trifluoressigsäure lieferte in quantitativer Ausbeute das Diamin **24** als Trifluoroacetat.

Durch die direkte Dimerisierung des bereits entschützten Amins **22** konnte die Ausbeute der Dimerisierungsreaktion auf 80 % gesteigert werden (Abbildung 29). Das so erhaltene Dimer **24** konnte ohne weitere Aufreinigung als Trifluoroacetat für die Immobilisierung auf Polystyroloberflächen verwendet werden.

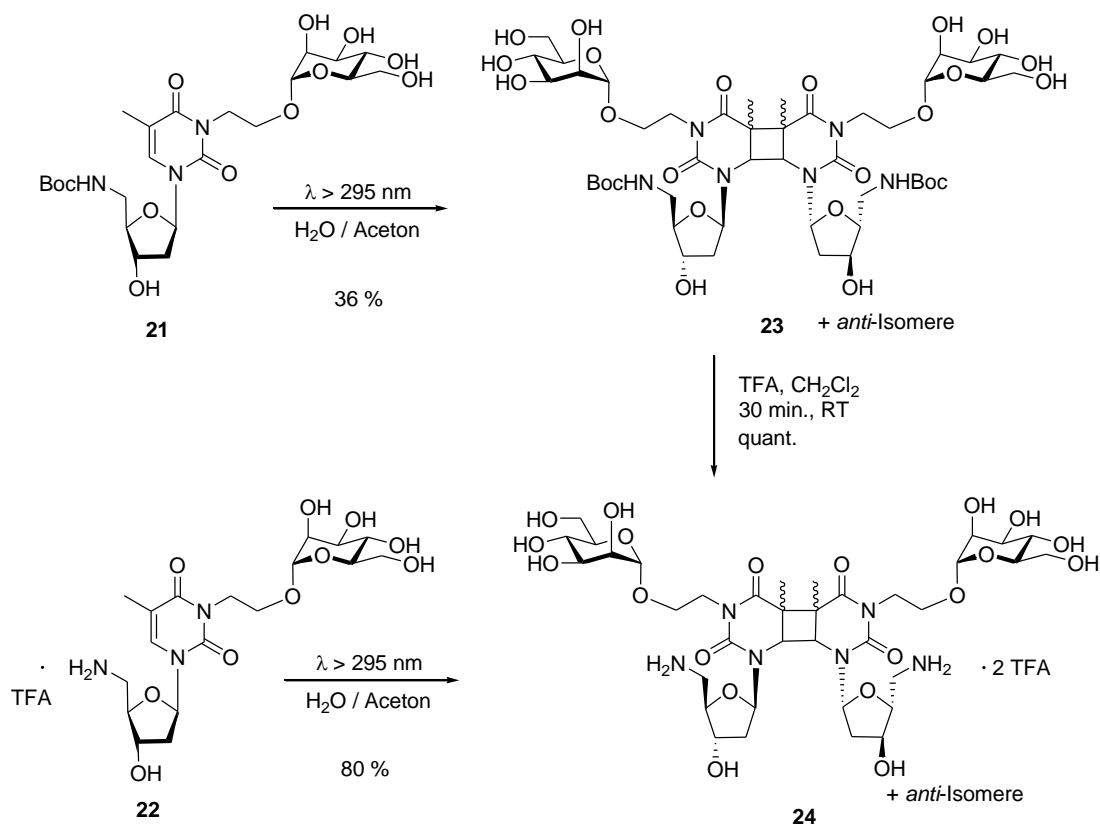


Abbildung 29: Photodimerisierung des Boc-geschützten Amins **21** und anschließende Entschützung zum Diamin **24**.

Ausgehend von den zu Beginn des Projektes von K. SCHWEKENDIEK erhaltenen Ergebnissen wird erwartet, dass an die mit dem Glycothymidin-Dimer **24** beschichtete Oberfläche weniger Bakterien binden als an die mit dem Monomer **22** beschichtete Oberfläche. Allerdings muss dahin gestellt bleiben, ob die hier durchgeführten Untersuchungen mit denen von K. SCHWEKENDIEK stringent vergleichbar sind (für die weitere Diskussion siehe weiter unten). Für die ehemals durchgeführten Kontrollexperimente wurde das photochemisch inerte Mannosid **4** (Abbildung 30) auf

Polystyrolmikrotiterplatten immobilisiert und unter denselben Bedingungen bestrahlt, wie sie für die Belichtung der Glycothymidin-Oberflächen verwendet wurden.

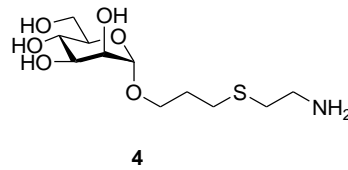


Abbildung 30: Das photochemisch stabile Mannosid 4 wurde für Kontrollexperimente auf der Polystyroloberfläche verwendet.

Damals ergaben sich allerdings ambivalente Ergebnisse: Die Belichtungsreaktionen wurde alle unter Zugabe von 100 μ L Wasser pro Well durchgeführt. Wenn dieses Wasser während der Belichtung größtenteils verdampfte, dann zeigte sich im durchgeführten Adhäsionsassay für die Kontrollsubstanz **4** eine verminderte bakterielle Adhäsion infolge der Belichtung. Da es sich bei Verbindung **4** um eine photochemisch stabile Verbindung handelt, kann diese sich infolge der Bestrahlung nicht verändert haben. Folglich ist die verminderte bakterielle Adhäsion auf eine Veränderung der Polystyroloberfläche zurückzuführen, die durch die energiereiche Strahlung ausgelöst wurde. Wenn jedoch durch Zugabe von Wasser während der Belichtung dafür gesorgt wurde, dass der Wasserstand in den Wells nicht abnahm, dann zeigte sich vor und nach der Belichtung kein Unterschied in der bakteriellen Adhäsion.

Angeichts dieser Beobachtung mussten die von K. SCHWEKENDIEK erhaltenen Ergebnisse überprüft werden. Wenn die verminderte bakterielle Adhäsion beim Kontrollexperiment auf eine Zerstörung der Polystyroloberfläche zurückzuführen ist, ist anzunehmen, dass dieser Effekt bei den Experimenten mit dem Aminoglycothymidin **22** ebenfalls auftritt. Daher wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Adhäsionsstudien mit einem optimierten Belichtungs-Setup durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, die Oberfläche nicht zu heiß werden zu lassen. Das Problem der Austrocknung trat daher bei den hier beschriebenen Experimenten nicht auf.

Für die Adhäsionsstudien wurden drei verschiedene Glycothymidin-funktionalisierte Oberflächen dargestellt und miteinander verglichen: eine mit dem Monomer **22** funktionalisierte Oberfläche, die direkt untersucht wurde; eine mit dem Monomer **22** beschichtete Oberfläche, die vor dem Adhäsionstest einer Bestrahlung mit einer

Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm ausgesetzt wurde und eine direkt mit dem Dimer **24** funktionalisierte Oberfläche. Die schematische Darstellung des durchgeführten Adhäsionsassays ist in Abbildung 32 zu sehen. Die eingeführte Aminogruppe erlaubt die Immobilisierung von Glycothymidin-Monomer **22** und dem Dimer **24** auf vorfunktionalisierten 96-Well-Polystyrol-Mikrotiterplatten der Firma Nunc. Zur Immobilisierung wurden Lösungen von Monomer **22** und Dimer **24** in Carbonatpuffer hergestellt und in Konzentrationen von 2.63 mM bis 0.8 μ M verwendet. Der Konzentrationsbereich wurde so gewählt, dass er die Glycothymidin-Konzentrationen einschließt, die sich in den von K. SCHWEKENDIEK durchgeführten Tests als relevant erwiesen haben. Um die Bindungsaffinität von Glycothymidin-Monomer **22** und dem Dimer **24** vergleichen zu können, wurden beide in serieller Verdünnung auf dieselbe Platte immobilisiert (Abbildung 32 a).

Es ist möglich, dass die immobilisierten Dimere teilweise nur über eine der beiden Aminogruppen an die Oberfläche gebunden sind, während die andere Aminogruppe frei bleibt (Abbildung 31). Dies dürfte jedoch keinen Einfluss auf die folgenden Untersuchungen haben, da sich die Valenz der Verbindungen dadurch nicht verändert.

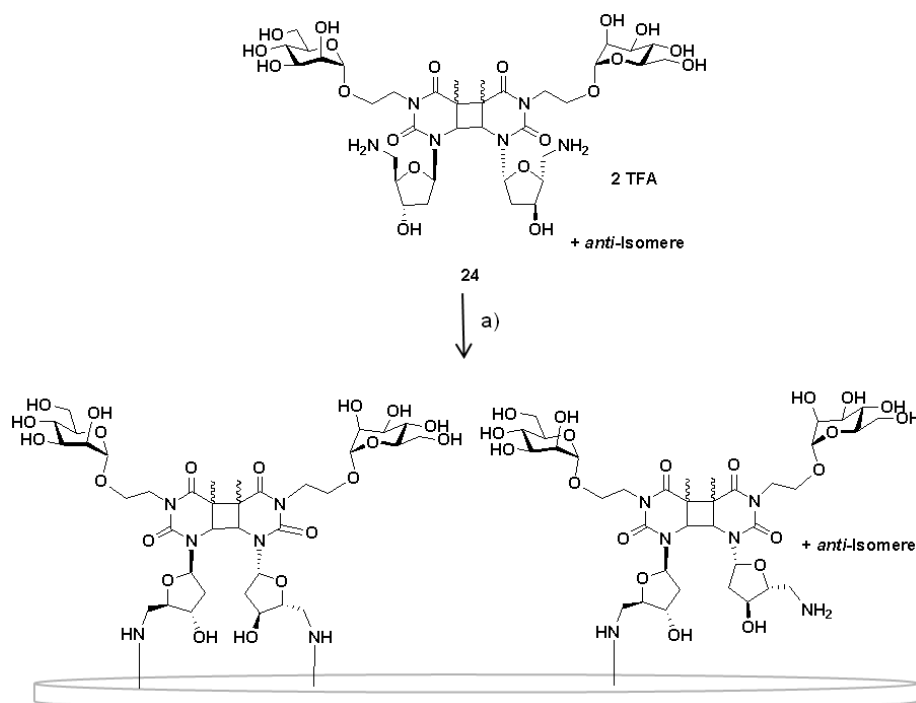


Abbildung 31: Bei der Immobilisierung des Dimers **24** kann die Verbindung sowohl über eine, als auch über beide Aminogruppen an die Oberfläche gebunden werden. a) Für die Immobilisierung wurde eine vorfunktionalisierte Mikrotiterplatte mit einer Lösung von **24** in Carbonatpuffer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

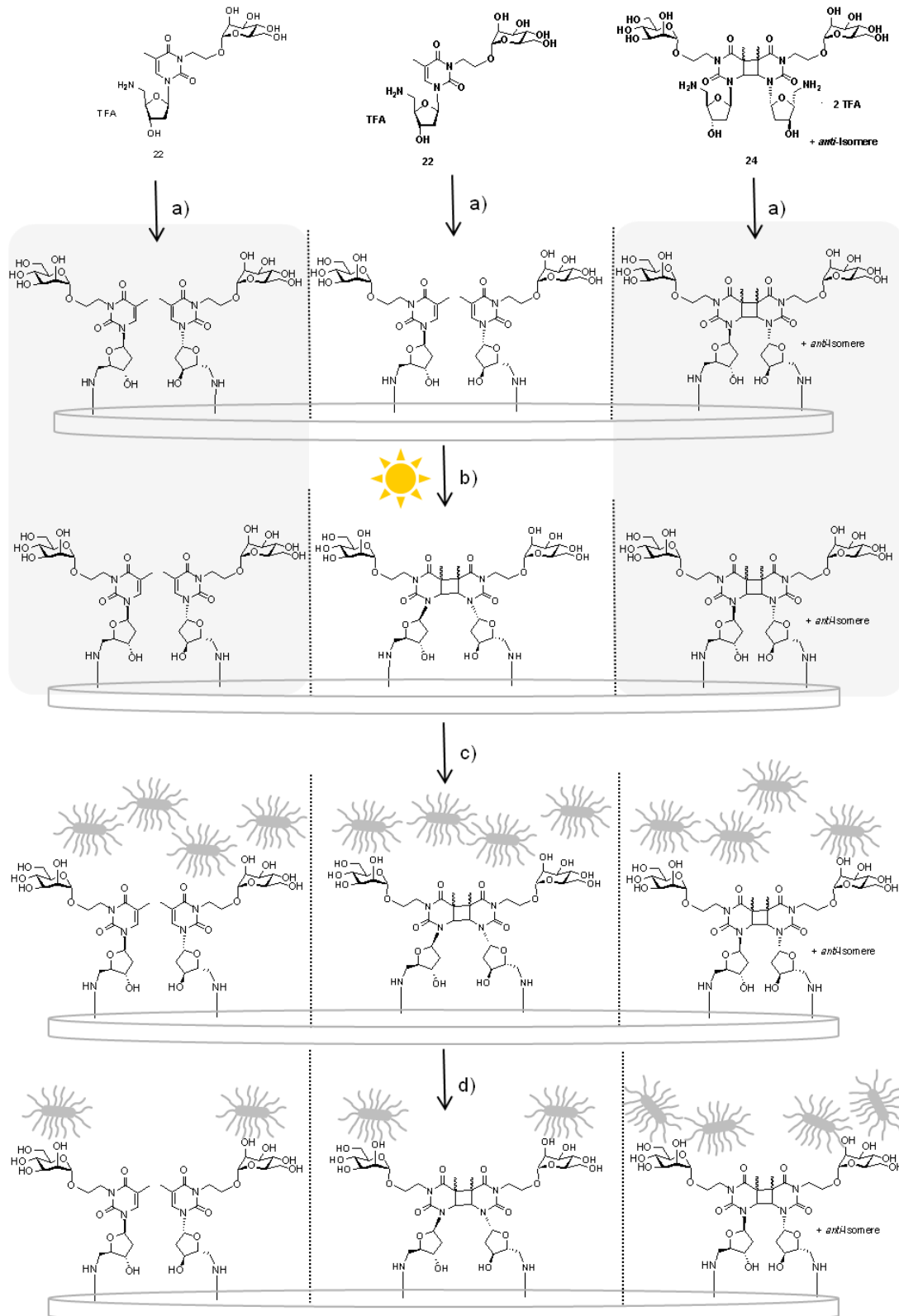


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Adhäsionsassays. a) Beschichtung der Mikrotiterplatte mit dem Liganden 21 und dem Dimer 23 und b) Belichtung einer Hälfte der mit Monomer 21 beschichteten Oberflächen mit Wellenlängen von $\lambda > 295 \text{ nm}$. Alle anderen Wells wurden durch Abdeckung mit Aluminiumfolie vor Lichteinwirkung geschützt (grau hinterlegte Flächen. c) Inkubation aller Wells mit GFP-transfizierten *E. coli*-Bakterien und d) Quantifizierung der Oberflächen-gebundenen Bakterien durch Auslesen der Fluoreszenz nach einem Waschschriff.

Nicht umgesetzte funktionelle Gruppen auf der Platte wurden mit einer Ethanolaminlösung in Carbonatpuffer blockiert, um eine kovalente Bindung von Proteinen an freie Amingruppen zu verhindern. Die Hälfte der mit dem Monomer **22** beschichteten Wells wurde für 3 h bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm belichtet, während alle anderen Wells zum Schutz vor Bestrahlung mit Alufolie abgedeckt wurden. Auf den Zusatz eines Tripletsensitizers wurde hier verzichtet, da die Dimerisierung von Thymidin in immobilisierter Form aus dem Singulettzustand erfolgen sollte.^[74] So wurden drei verschiedenen funktionalisierte Oberflächen erhalten: 1. eine mit dem Glycothymidin-Monomer **22** funktionalisierte Oberfläche; 2. eine mit auf der Oberfläche belichtetem Monomer und 3. eine direkt mit dem Glycothymidin-Dimer **24** funktionalisierte Oberfläche (Abbildung 32 b). Um die bakterielle Adhäsion an die erhaltenen Glycothymidin-Arrays zu untersuchen, wurde alle drei Teile der Mikrotiterplatte gleichermaßen für 90 min. bei 37 °C mit GFP-markierten *E. coli*-Bakterien inkubiert (Abbildung 32 c). Nach abschließenden Waschschrritten wurden die an die Platte gebundenen Bakterien durch Auslesen der Fluoreszenz quantifiziert (Abbildung 32 d).

Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten sind im Folgenden dargestellt (Abbildung 33). Sie wurden jeweils als Mittelwerte von Dreifachmessungen ermittelt. Die für das Glycothymidin-Dimer **24** dargestellten Konzentrationen sind bezogen auf die α -D-Mannosyleinheiten und also Valenz-korrigiert. Die Ergebnisse von Monomer **22** und Dimer **24** sind also direkt miteinander vergleichbar. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert mit der Bindungsaffinität der glycosylierten Oberflächen zum Lektin FimH. Die Bindungsaffinität sinkt wie erwartet mit abnehmender Konzentration der zur Immobilisierung verwendeten Glycothymidin-Lösung. In Abbildung 33 sind zunächst nur die aus den Experimenten mit den Monomer-funktionalisierten Oberflächen erhaltenen Fluoreszenzintensitäten aufgeführt. Verglichen werden die Werte vor und nach der Belichtung der Oberfläche. Die Bindung der *E. coli*-Bakterien an die mit dem Glycothymidin-Monomer **22** funktionalisierte Oberfläche (Oberfläche 1) unterscheidet sich nicht signifikant von der Bindung an die belichtete Oberfläche (Oberfläche 2; Abbildung 32). Hier ist im Gegensatz zu den Ergebnissen von K. SCHWEKENDIEK kein Trend erkennbar. Daher muss angenommen werden, dass es sich bei dem von K. SCHWEKENDIEK beobachteten Effekt um ein Artefakt handelte, welches vermutlich auf die Zerstörung der Oberfläche durch die energiereiche Strahlung zurückzuführen ist.

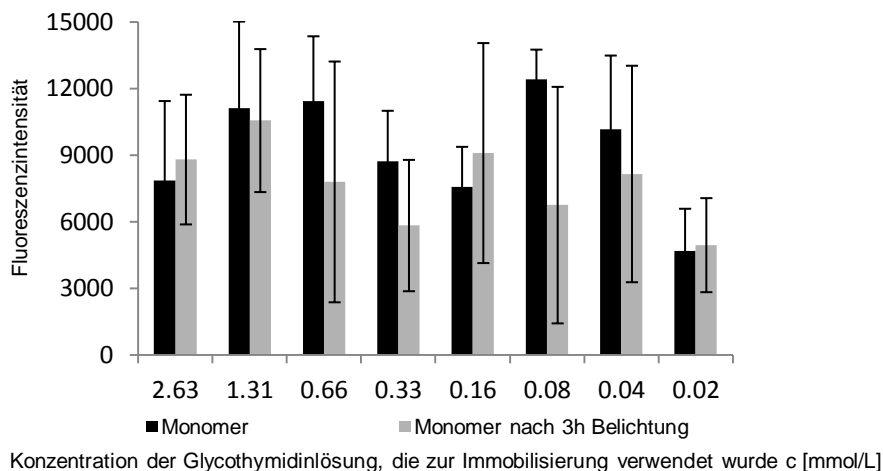


Abbildung 33: Glycothymidin-Monomer **22** wurde auf eine Mikrotiterplatte immobilisiert. Die eine Hälfte der Platte wurde einer dreistündigen Bestrahlung bei $\lambda > 295$ nm ausgesetzt, während die andere Hälfte vor Lichteinwirkung geschützt wurde. Im Adhäsionsassay zeigte sich bezüglich der bakteriellen Adhäsion kein Unterschied zwischen bestrahlter und unbestrahlter Oberfläche. Die angegebene Fluoreszenzintensität ergibt sich aus den gemessenen Fluoreszenzwerten der Oberflächen-gebundenen Bakterien abzüglich der für die Blindprobe ohne Glycothymidin-Beschichtung erhaltenen Werte.

Die bakterielle Adhäsion scheint hier also unabhängig vom Zustand der Oberfläche zu sein. Dies muss jedoch differenzierter betrachtet werden. Die Fluoreszenzintensitäten der an Glycothymidin-Monomer **22** adhärenen Bakterien sind sehr gering und weisen im Rahmen der Messgenauigkeit vor und nach der Belichtung keinen erkennbaren Unterschied auf. Mögliche Erklärungen hierfür sind:

1. Es ist keine Dimerisierung der immobilisierten Thymineinheiten erfolgt. Dies könnte z.B. der Fall sein, wenn die immobilisierten Thymin-Einheiten zu weit voneinander entfernt sind. Es wurden sowohl hohe als auch niedrige Glycothymidin-Konzentrationen für die Immobilisierung verwendet. Die maximale Belegungsdichte ist jedoch durch die Verwendung vorfunktionalisierter Mikrotiterplatten vorgegeben.
2. Es ist nur teilweise Dimerisierung erfolgt und noch so viel Monomer auf der Oberfläche vorhanden, dass sich die bakterielle Adhäsion an die bestrahlte Fläche nicht wesentlich von der an die unbestrahlte unterscheidet.
3. Die Dimerisierung hat keine Auswirkung auf die bakterielle Adhäsion.

Diese Punkte können ohne eine Charakterisierung der Oberfläche nicht hinreichend geklärt werden. Die erhaltenen Ergebnisse lassen bezüglich der Abhängigkeit bakterieller Adhäsion vom Zustand des Glycoarrays nach Belichtung keine abschließende Interpretation zu.

Bei der Betrachtung des in Lösung erhaltenen Dimers **24** hingegen ist die vollständige Dimerisierung durch Isolierung und Immobilisierung des reinen Dimers gesichert. Auch die Veränderung der Polystyroloberfläche durch Bestrahlung kann in diesem Fall ausgeschlossen werden. Das in Lösung dimerisierte Dimer **24** (Oberfläche 3) zeigt im Adhäsionstest eine deutlich erhöhte bakterielle Adhäsion (Abbildung 34) und weist damit eine höhere Bindungsaffinität auf als das Monomer **22**. Dies ist sehr wahrscheinlich vor allem durch den Multivalenzeffekt des Dimers zu erklären. Eine erhöhte Bindung infolge einer konformationellen Veränderung der Oberfläche ist natürlich nicht auszuschließen, lässt sich aber auch nicht schlüssig untermauern und bleibt an dieser Stelle Spekulation.

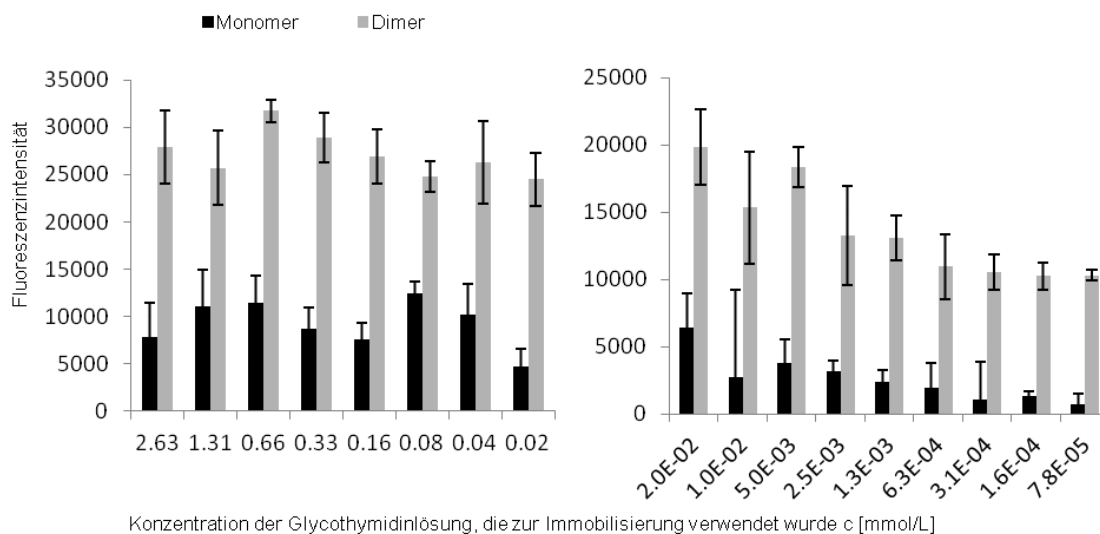


Abbildung 34: Glycothymidin-Monomer **22** und das Dimer **24** wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und zur Untersuchung der bakteriellen Adhäsion verwendet. Für das Dimer **24** (grau) wurde eine deutlich höhere Adhäsion gemessen als für das Monomer **22** (schwarz). Die angegebene Fluoreszenzintensität ergibt sich aus den gemessenen Fluoreszenzwerten abzüglich der für die Blindprobe ohne Glycothymidin-Beschichtung erhaltenen Werte. Die für niedrige Glycothymidin-Konzentrationen erhaltenen Werte sind gesondert dargestellt (rechts).

ZUSAMMENFASSUNG: DIREKTE IMMOBILISIERUNG DES AMINOGLYCOTHYIMIDIN-DIMERS

Das Aminoglycothymidin-Dimer **24** konnte in Lösung dargestellt und als Isomerengemisch sauber isoliert werden. Nach Immobilisierung auf Polystyrolmikrotiterplatten konnten Adhäsionsstudien mit *E. coli*-Bakterien durchgeführt werden. Der Vergleich von Monomer **22** und Dimer **24** zeigt eine deutlich erhöhte Bindungsaffinität für das Dimer **24**. Diese ist durch den Multivalenzeffekt bedingt und liefert keine Aussage über die Konformationsabhängigkeit der Adhäsion.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Dimer, sofern es in Lösung synthetisiert und anschließend immobilisiert wurde, eine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber Typ-1-fimbrierten Bakterien aufweist. Findet die Belichtung auf der Oberfläche statt, so ist kein Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen dem immobilisierten Monomer **22** und dem, auf der Oberfläche belichteten Monomer erkennbar. Gründe hierfür könnten eine unvollständige oder nicht erfolgte Dimerisierung auf der Oberfläche sein. Das entsprechende Experiment auf Polystyroloberflächen muss als nicht aussagekräftig angesehen werden.

3.2 Thymidin-SAMs auf Goldoberflächen

Neben den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Glycoarrays auf Polystyrol, lassen sich auch mit anderen Materialien glycosylierte Oberflächen erzeugen und für Adhäsionstests einsetzen. Hier sei die Bildung von Kohlenhydrat-terminierten Oberflächen mit Hilfe von selbstorganisierenden Monolagen (SAMs; engl.: self assembled monolayer) der entsprechenden Glykokonjugate genannt. SAMs ermöglichen die Präsentation dicht gepackter Substrate in hoch geordneter, homogener Weise auf einer Oberfläche. In der Glycobiologie wurden SAMs an der Kopfgruppe mit Kohlenhydrat-Einheiten funktionalisiert. Diese sogenannten Glyco-SAMs^[49,106,114–117] erhalten für die Glycowissenschaften als „zweidimensionales Glycomimetikum“ immer mehr Bedeutung und werden häufig für Untersuchungen von Kohlehydrat-Protein-Wechselwirkungen verwendet.^[114]

In den 80er Jahren wurden selbstorganisierende Monolagen zum ersten Mal in der Literatur erwähnt.^[118–121] Seitdem fanden sie zahlreiche Anwendung,^[122–124] z. B. in der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie; engl. surface plasmon resonance spectroscopy).^[125] Das Prinzip der Selbstorganisation kann als Bildung komplexer Strukturen aus definierten Einheiten verstanden werden. Dies ist ein verbreitetes Konzept in der Natur, wo es beispielsweise bei der Ausbildung von Membranen aus Lipiden auftritt. Der schematische Aufbau von SAMs ist in Abbildung 35 gezeigt.

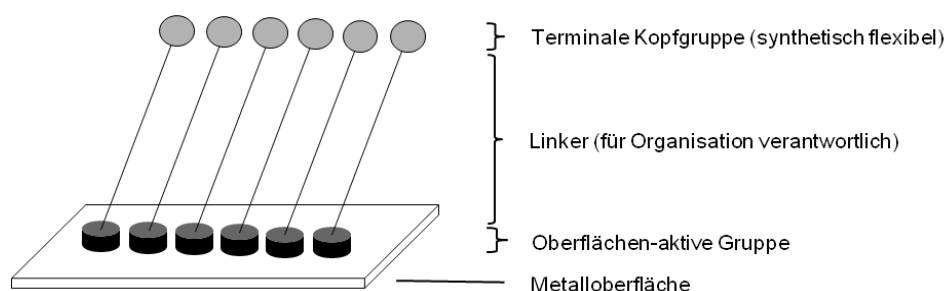


Abbildung 35: Schematisch dargestellt ist der allgemeine Aufbau eines SAMs, bestehend aus einer Kopfgruppe, einem Linker und einer Oberflächen-aktiven Gruppe, über die das Molekül auf der Metalloberfläche verankert wird.

Die Ausbildung der SAMs geschieht durch spontane Adsorption einer oberflächenaktiven Gruppe auf der Metalloberfläche. Die Struktur der durch Chemisorption gebildeten

Monolagen wird definiert durch einen Linker – häufig durch eine Alkylkette dargestellt und für die Organisation der Monolagen verantwortlich- und eine terminale Kopfgruppe, die je nach Anwendungsbereich variieren kann.

Die wohl bekannteste Methode der SAM-Bildung ist die Immobilisierung organischer Thiole auf Goldoberflächen.^[122,126] Aufgrund der starken Affinität von Schwefel zu Gold bilden sich starke S-Au-Bindungen und somit eine stabile Monolage auf der Oberfläche aus. Durch den Einsatz verschiedener Thiole können auch gemischte Monolayer dargestellt werden. Für die Immobilisierung können nicht nur freie Thiole verwendet werden, sondern auch Thioacetate oder Disulfide.^[118] Die so erhaltenen SAMs finden entweder direkt Anwendung oder werden durch Kupplungsreaktionen auf der Oberfläche weiter modifiziert. Dazu eignen sich die sogenannten „Click-Reaktionen“ besonders, da sie meist mit hohen Ausbeuten und ohne zusätzliche Reagenzien ablaufen. Neben den Goldoberflächen können aber auch andere Oberflächen für die Bildung von SAMs verwendet werden, wie beispielsweise Si oder SiO₂.^[127–129] G. M. WHITESIDES berichtete 2002 von der Verwendung Gold-beschichteter 96-Well-Mikrotiterplatten für die Darstellung von SAMs zur Inhibition bakterieller Adhäsion.^[130] Bei der Vielzahl an Möglichkeiten zur Darstellung von SAMs ist die Vielzahl der Anwendungsbereiche nicht verwunderlich.

Durch Variation der terminalen Gruppe kann mit Hilfe der SAMs eine große Bandbreite von Oberflächen mit verschiedenen Eigenschaften erzeugt werden. So eignet sich diese Technik für den Einsatz in verschiedensten Bereichen. SAMs werden genutzt, um chemische Sensoren darzustellen, um Biomoleküle auf Oberflächen zu immobilisieren oder um das Benetzungsverhalten von Oberflächen zu beeinflussen.^[123,125,131–133] In der Biologischen Chemie werden SAMs als Zell-Mimetika zur Untersuchung molekularer Details in biologischen Erkennungsprozessen verwendet.^[49,114–117,130,134]

Genauso vielfältig wie die Anwendung ist die zur Oberflächencharakterisierung verwendete instrumentelle Analytik.^[135,136] Für eine vollständige Charakterisierung der SAMs, die eine Dicke von nur einigen Nanometern haben, ist die Kombination verschiedener Methoden nötig. Mit Hilfe der Ellipsometrie kann beispielsweise die Schichtdicke der immobilisierten Substanz ermittelt werden. Kontaktwinkelmessungen geben Aufschluss über das Benetzungsverhalten, die Polarität und die Ordnung einer

Oberfläche. Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS; *engl.* X-ray photoelectron spectroscopy) liefert Informationen zur elementaren Zusammensetzung der SAMs, FT-IR-spektroskopische Untersuchungen bieten die Möglichkeit sowohl die Orientierung der SAMs als auch bestimmte funktionelle Gruppen zu identifizieren. Mit AFM-Messungen lässt sich die Oberflächen-Topologie untersuchen. Nur die Kombination dieser Methoden ermöglicht eine vollständige Charakterisierung der Oberfläche. Die einzelnen Methoden können hier nicht in vollem Umfang dargelegt werden. Lediglich die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden werden eingehender beschrieben.

Ein Nachweis für die Dimerisierung immobilisierter Glycothymidin-Derivate auf Polystyrol-Mikrotiterplatten konnte bisher nicht erbracht werden. Grund hierfür waren unter anderem die für viele analytische Methoden störenden Eigenschaften des Polystyrols. Die Verwendung von Gold als Oberfläche für eine Immobilisierung von Thymidin liefert eine ganze Reihe von Möglichkeiten zur Untersuchung der immobilisierten Substrate. In Kooperation mit K. KATHIRVEL aus der Arbeitsgruppe von F. TUCZEK wurden deshalb Thymidin-SAMs auf Goldoberflächen dargestellt und mittels Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) vermessen.

Die Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie findet häufig Anwendung bei der Untersuchung von SAMs. Goldoberflächen eignen sich besonders gut als Substrat für IRRAS-Messungen, da Gold eine hohe Reflektivität besitzt. IRRAS-Messungen liefern sowohl Informationen zur molekularen Zusammensetzung als auch bezüglich des Ordnungsgrades in monomolekular dünnen Filmen auf der Goldoberfläche. Die Messungen ermöglichen aber auch die Bestimmung der Orientierung relativ zur Oberfläche. Bei dieser Messmethode wird die Oberfläche mit Licht im infraroten Bereich bestrahlt. Durch diese Bestrahlung kommt es zur Polarisierung auf der Metalloberfläche. Der elektrische Anteil des auf die Oberfläche auftreffenden Lichts wechselwirkt mit den in der Oberfläche vorhandenen Ladungen. Das von außen einwirkende elektrische Feld des Lichts wird in zwei Komponenten, senkrecht und parallel, zur Oberfläche aufgespalten (Abbildung 36, links). Das durch Polarisierung erzeugte, parallel zur Oberfläche gerichtete Feld ist dem äußeren Feld (der Ursache) entgegengesetzt gerichtet. Sobald die Felder gleich stark sind heben sie sich gegenseitig auf und es werden keine weiteren Polarisationsladungen aufgebaut. Im Gegensatz dazu addiert sich die senkrecht

zur Oberfläche wirkende Feldkomponente zum äußeren Feld, wird also verstärkt. Dadurch ergibt sich die auf Oberflächen geltende Auswahlregel, dass nur diejenigen Schwingungen verstärkt werden, die eine Komponente des induzierten Übergangsdipolmoments senkrecht zur Oberfläche besitzen. Schwingungen, die lediglich ein parallel zur Oberfläche ausgerichtetes Dipolmoment haben, können nicht angeregt werden. Im IRRAS-Spektrum werden daher im Allgemeinen weniger Banden beobachtet als im IR-Spektrum der reinen Substanz.

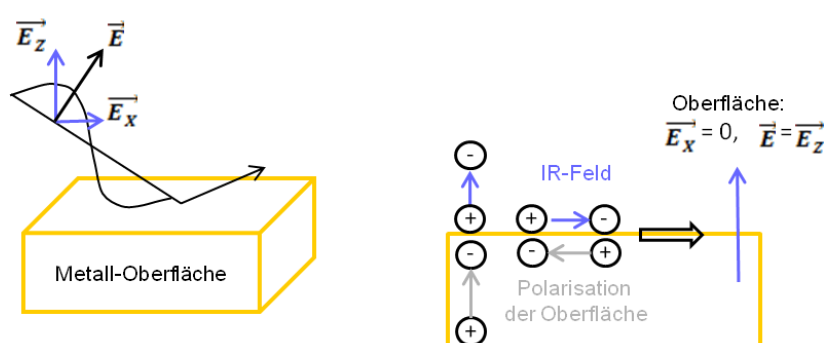


Abbildung 36: Schematisch dargestellt ist die Aufspaltung der elektrischen Feldkomponente des auf die Oberfläche auftreffenden Lichts (links) und die Polarisation der Oberfläche durch das Infrarot-Licht (rechts) abgewandelt nach R. ARNOLD.^[137]

Hier soll die IRRAS-Methode dazu genutzt werden die auf der Oberfläche immobilisierten Thymin-Derivate zu charakterisieren und eventuell durch Belichtung verursachte Veränderungen auf der Oberfläche zu verfolgen.

3.2.1 Synthese und Immobilisierung von Thyminylthiol-Komponenten

Für die Darstellung von Thymin-SAMs auf Goldoberflächen ist es zunächst erforderlich eine aktive Gruppe einzuführen, über die an die Goldoberfläche gebunden werden kann. Um bei der Immobilisierung die hohe Affinität von Schwefel zu Gold auszunutzen, wurde das Thioacetat als Oberflächen-aktive Gruppe gewählt. Das hat den Vorteil, dass durch die Ausbildung einer starken S-Au-Bindung die Monolayer auf Gold sehr stabil verankert sind. Hierfür wurde der im Arbeitskreis LINDHORST bereits für „Click on SAM“ verwendete thio-funktionalisierte Alkin-Linker **25**^[49] in Kooperation mit C. GRABOSCH synthetisiert und in einer Kupfer-(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition mit dem

Azidothymidin **17** umgesetzt (Abbildung 37). Das Triazol **26** wurde in 74 % Ausbeute erhalten und konnte für den Aufbau von SAMs auf Goldoberflächen genutzt werden.

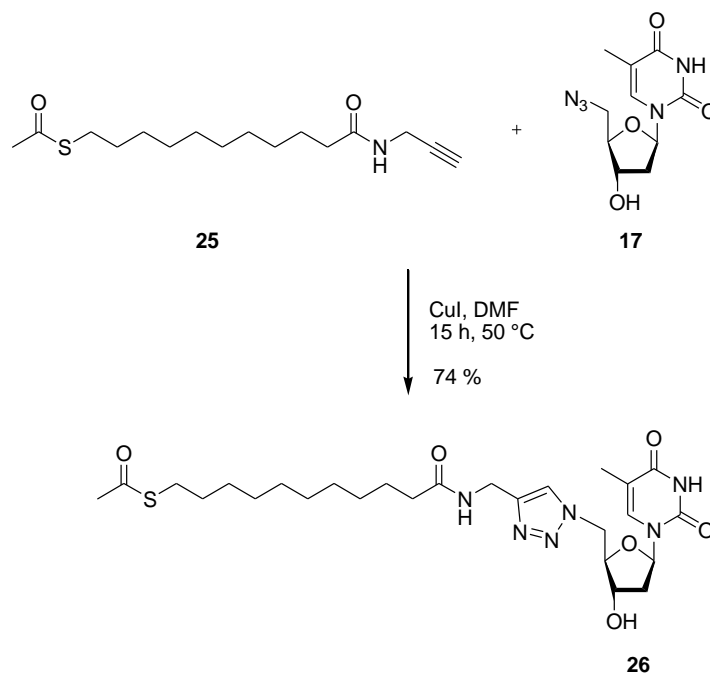


Abbildung 37: Azidothymidin **17** wurde mittels „Click-Chemie“ mit dem Alkin-Linker **25** zum Thymidin-verknüpften Thioacetat **26** umgesetzt.

Für die SAM-Bildung wurden goldbedampfte Glasplatten der Firma EMF corporation verwendet. Bei diesen Substraten handelte es sich um eine Glasplatte, die zunächst mit einer Titanschicht und anschließend mit einer Goldschicht bedampft wurde. Die Substrate wurden unmittelbar vor der Immobilisierung für 20 sec. in frisch zubereiteter Piranha-Lösung (H_2O_2 : H_2SO_4 ; 3 : 7) gereinigt, anschließend mit Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Immobilisierung der Thiolkomponente **25** erfolgte aus einer 1 mM ethanolischen Lösung. Aus Löslichkeitsgründen wurde für die Komponente **26** eine 1 mM Lösung in DCM : MeOH (10:1) angesetzt. Die Goldwafer wurden bei Raumtemperatur in die entsprechende Thiol-Lösung gelegt und für 24 h unter Lichtausschluss in der Lösung belassen (Abbildung 38).

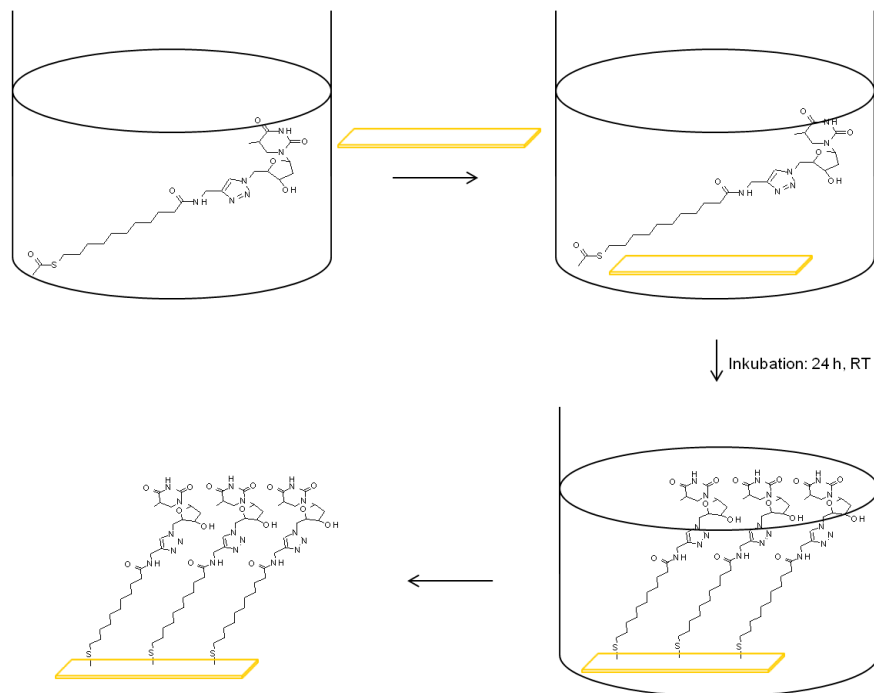


Abbildung 38: Inkubation eines Goldwafers in Thiol-Lösung zur Bildung von SAMs auf der Goldoberfläche.

Anschließend wurde das Substrat mit dem entsprechenden Lösungsmittel gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und sofort vermessen. Die erhaltenen SAMs sind schematisch in Abbildung 39 dargestellt.

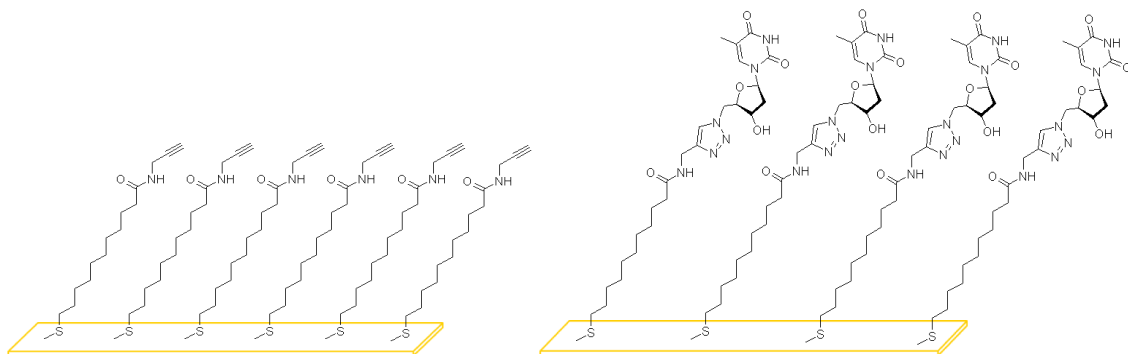


Abbildung 39: Schematische Darstellung der aus dem Thiollinker 25 (links) und dem Thymidinylthiol 26 (rechts) gebildeten SAMs auf Goldoberflächen.

3.2.2 IRRAS-Messungen

Für die Untersuchung der auf Goldoberflächen immobilisierten Thiolkomponenten mittels IRRAS ist es notwendig sich vorab mit den Schwingungen der Moleküle auseinander zu setzen. Es wurden zunächst die Schwingungen des Alkin-Linkers **25** betrachtet. Charakteristische Schwingungen dieses Moleküls sind die NH-, die CO- und die Alkin-Schwingung. Es wurden im Vorfeld IR- und Raman-Spektren der Substanz aufgenommen und mit den berechneten Daten verglichen (Abbildung 40). Dabei zeigte sich, dass die Schwingung der Alkingruppe Raman-aktiv ist. Daher ist im Raman-Spektrum eine stark ausgeprägte Bande im Bereich der Alkin-Schwingung (2126 cm^{-1}) zu sehen. Aufgrund des Alternativverbotes tritt diese Bande im IR-Spektrum nicht auf. Im Gegensatz dazu sind die NH-Schwingung der Amidgruppe (3305 cm^{-1}) sowie die CO-Schwingung (1551 cm^{-1}) Infrarot-aktiv und Raman-verboden.

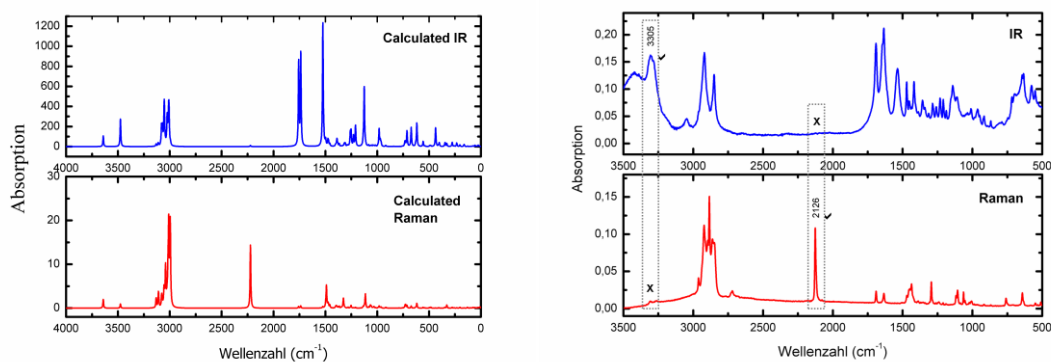


Abbildung 40: Berechnetes IR- und Raman-Spektrum (links) und experimentell ermitteltes IR- und Raman-Spektrum (rechts) des Alkin-Linkers 25.

Die aus dem Alkin-Linker **25** präparierten SAMs wurden mittels Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie vermessen. Die hieraus erhaltenen Daten wurden mit den IR-Daten des Alkin-Linkers **25** verglichen (Abbildung 41). Die SAc-Bande bei 1690 cm^{-1} , welche im IR ein deutliches Signal liefert, ist im IRRAS nicht mehr zu sehen. Dies bestätigt eine erfolgreiche Ausbildung der Schwefel-Gold-Bindung. Auch im IRRAS-Spektrum ist aufgrund des Alternativverbotes im Bereich von 2100 bis 2200 cm^{-1} natürlich keine Alkin-Bande zu sehen. Die CH_2 -Schwingungen sind im Bereich von 2800 - 2920 cm^{-1} angesiedelt. Bei 3319 cm^{-1} tritt eine Bande auf, die der NH-Schwingung zugeordnet werden kann (Abbildung 41). Die CO-Schwingung ist bei 1551 cm^{-1} zu sehen. Diese beiden Banden konnten mit Polarisations-Modulations-Infrarot-Reflektions-

Absorptions-Spektroskopie (PM-IRRAS) bestätigt werden. PM-IRRAS hat im Vergleich zum konventionellen IRRAS-mode den Vorteil, dass störende Interferenzen von Wasserdampf und Kohlenstoffoxid eliminiert werden können und die Signale in diesem Frequenzbereich dadurch klarer erkennbar sind.

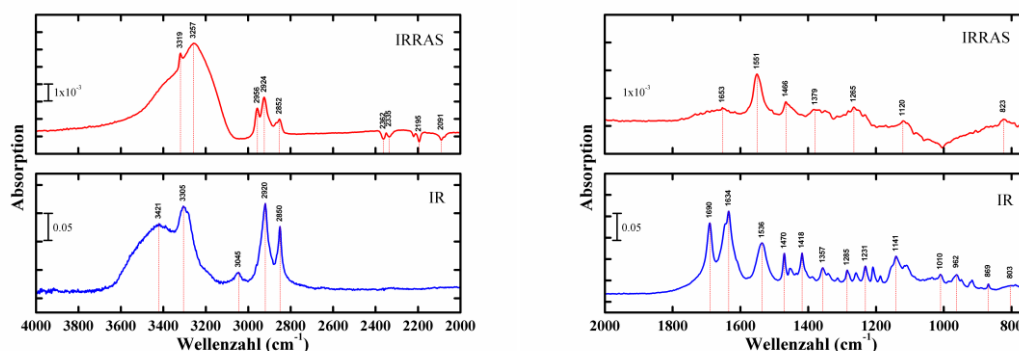


Abbildung 41: Hochfrequenzbereich der IR-spektroskopischen Daten des Alkin-Linkers 25 (links) und Niedrigfrequenzbereich (rechts). IRRAS-Spektrum des Alkin-SAMs (jeweils oben) und IR-Spektrum des Alkin-Linkers 25 (jeweils unten).

Für das Thymidin-Triazol **26** konnten aus technischen Gründen keine Berechnungen durchgeführt werden. Die experimentell ermittelten Daten sind in Abbildung 42 dargestellt. Das IR-Spektrum zeigt deutlich die Schwingungen der Amidbindungen im Bereich von 3400 bis 3190 cm^{-1} . Bei 3065 cm^{-1} sind die =CH-Schwingungen des Triazols und des Thymins, bei 2917 cm^{-1} die CH_3 - und bei 1690 cm^{-1} die SAc-Schwingung zu sehen.

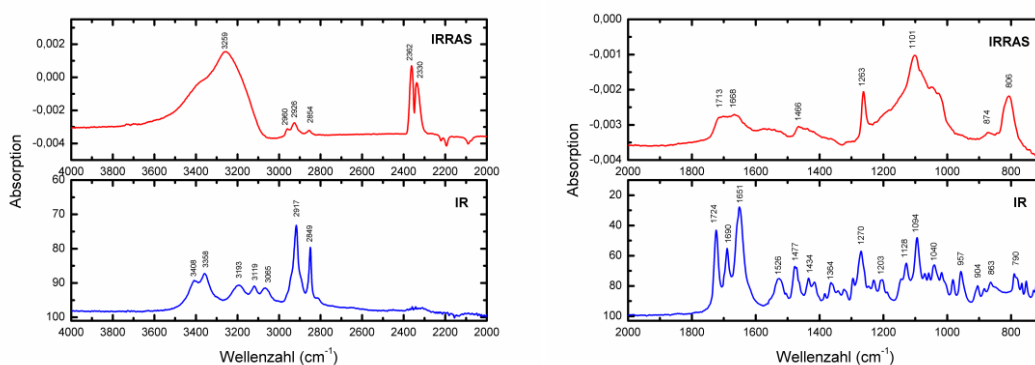


Abbildung 42: Hochfrequenzbereich der IR-spektroskopischen Daten von Thymidin-Triazol 26 (links) und Niedrigfrequenzbereich (rechts). IRRAS-Spektrum des SAMs (jeweils oben) und IR-Spektrum des Thymidin-Triazols 26 (jeweils unten).

Für die SAM-Bildung des Triazols **26** wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen die direkte Immobilisierung des Thiols wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben und zum anderen die Basen-unterstützte Immobilisierung. Im letztgenannten Fall fand die Inkubation des Goldsubstrates unter Zugabe von 10^{-4}M NH_4^+OH zu der Thiollösung statt. Durch Zugabe der Base wird die Thioacetatgruppe während der Inkubation *in situ* entschützt und so die Ausbildung der Schwefel-Gold-Bindung unterstützt. Die Vermessung der nach Zugabe von Base entstandenen SAMs lieferte jedoch ein sehr unklares IRRAS-Spektrum mit sehr unscharfen, breiten Banden, die zum Teil nicht zugeordnet werden konnten. Eine basische Entschützung des Thioacetats **26** in Lösung und anschließende massenspektrometrische Untersuchung des Produktes trugen zur Aufklärung des Phänomens bei: das durch Entschützung frei werdende Thiolat-Anion **27** greift offenbar nukleophil in einer Michael-analogen Additionsreaktion an der Doppelbindung des Thymins an. Es entstehen Di- bis Oligomere der Thymin-Derivate (Abbildung 43). Somit sind bei der Basen-unterstützten Immobilisierung von Thymin-Derivaten keine geordneten Monolayer zu erwarten.

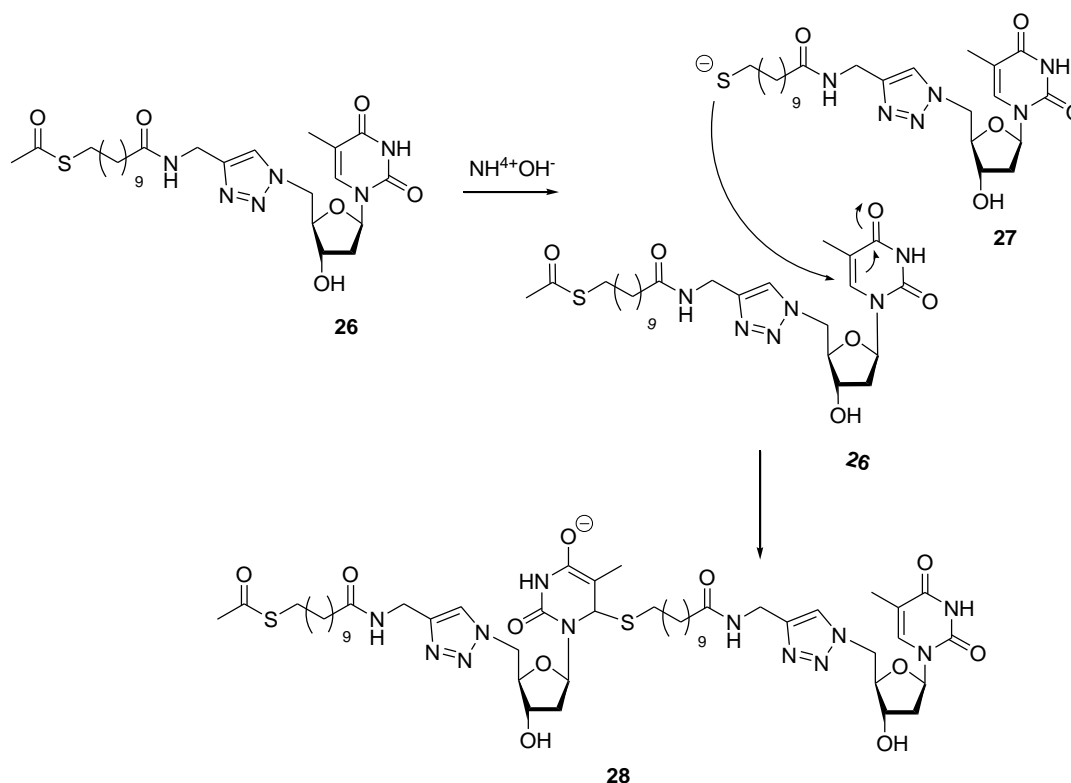


Abbildung 43: Nach basischer Entschützung reagiert das Thiolat-Anion **27** mit einem weiteren Molekül **26**, indem es nukleophil in einer Michael-analogen Additionsreaktion an der Doppelbindung des Thymins angreift. Es bildet sich das Dimer **28**. Auf diese Weise können auch Tri- und Oligomere entstehen.

Doch auch die direkte Immobilisierung lieferte kein ideales Spektrum. Obwohl einige Signalbanden klar zuzuordnen sind, sind diese recht breit. Dies kann zum einen bedeuten, dass aufgrund von zu geringer Konzentration oder geringer Reaktivität des Thioacetats keine dicht-gepackten Monolayer entstehen konnten. Zum anderen könnte die Entstehung der breiten Banden auf Wechselwirkungen der Thymin-Einheiten im Monolayer zurückzuführen sein. Letzteres scheint wahrscheinlich, denn die breiten Banden bei der Vermessung immobilisierter Thymin-Derivate wurden auch von RALSTON et al. beobachtet.^[138] Ferner könnte auch die beim Thymin auftretende Keto-Enol-Tautomerie eine Rolle bei der Entstehung der unscharfen Signale spielen. Eine weitere Schwierigkeit bei der Interpretation der Spektren stellen Signale dar, die auf Verunreinigungen aus der Umgebungsluft zurückzuführen sind und sich zum Teil mit den Signalen der Substanz überlappen. Unabhängig von der Ursache für die Entstehung der breiten Banden bedarf es einer Optimierung, bevor diese Methode als Nachweis für die Dimerisierung von Thymin-Einheiten auf der Oberfläche genutzt werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG: THYMIDIN-SAMS AUF GOLDOBERFLÄCHEN

Im Rahmen einer Arbeitskreis-internen Kooperation konnten die Thiolkomponenten **25** und **26** hergestellt und für die SAM-Bildung auf Goldoberflächen genutzt werden. Für die Darstellung der Thymidinylthiol-Komponente **26** wurde eine kupferkatalysierte „Click-Reaktion“ genutzt, um das 5'-Azidothymidin **17** mit dem Alkin-Linker **25** zu verknüpfen. Die gebildeten SAMs konnten mit Hilfe der Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie nachgewiesen werden.

Die Auflösung der Signale im IRRAS-Spektrum der Thymidinyl-SAMs ist nicht ideal, es bedarf also noch einiger Optimierungen, bevor diese Methode für den Nachweis der Dimerisierung auf der Oberfläche genutzt werden kann. Die Möglichkeit der Charakterisierung immobilisierter Thymidin-Derivate mittels IRRAS stellt jedoch bereits jetzt einen erheblichen Vorteil gegenüber der Immobilisierung auf Polystyroloberflächen dar.

Außerdem bieten sich durch die Verwendung von Goldoberflächen weitere Methoden zur Oberflächenanalytik an, wie beispielsweise Rastertunnelmikroskopie, Röntgen-photoelektronenspektroskopie oder Ellipsometrie. Auch die Stabilität der Gold-

oberflächen gegenüber UV-Strahlung ist für spätere Experimente von Nutzen. Ein weiterer Vorteil gegenüber den mit einem unbekanntem Spacer vorfunktionalisierten Polystyrol-Mikrotiterplatten ist die Kenntnis aller Bestandteile bei der Immobilisierung auf Goldoberflächen. Demnach stellt die Immobilisierung von Glycothymidin-Derivaten auf Gold trotz des Optimierungsbedarfs bei den IRRAS-Messungen einen viel versprechenden Ansatz für spätere Arbeiten dar.

3.3 Glycothymidin-SAMs auf Quarzglasoberflächen

Für Untersuchungen von Zellerkennungs- und Kommunikationsprozessen werden funktionalisierte Oberflächen als Modelle für die glycosylierte Zelloberfläche eingesetzt. Bei den hier untersuchten Glycothymidin-Derivaten spielt der Dimerisierungsprozess der Thymineinheiten auf der Oberfläche eine große Rolle. Daher ist eine Oberfläche erforderlich, die den Nachweis dieser Dimerisierung zulässt. Oberflächen aus Glas, Silizium oder Quarz bieten die Möglichkeit einer Oberflächencharakterisierung mit Hilfe optischer Methoden und sind daher besonders geeignet für die Immobilisierung der Glycothymidin-Derivate und deren Untersuchung auf der Oberfläche. Hydroxylierte Oberflächen erlauben, ebenso wie Metalloberflächen, eine Funktionalisierung durch SAM-Bildung (Abschnitt 3.2), wobei sich die resultierenden Monolagen durch eine hohe Stabilität auszeichnen. Eine Vielfalt an Molekülen mit unterschiedlichsten funktionellen Gruppen wurde auf Siliziumoxid-Oberflächen verankert und fand Anwendung in verschiedenen Bereichen der Chemie und angrenzenden Bereichen. Auf diese Weise können Oberflächen mit elektrochemischen, optischen oder magnetischen Eigenschaften^[131] hergestellt werden. Hydroxylierte Oberflächen wurden beispielsweise für die Herstellung chemischer Sensoren, für die Immobilisierung von Biomolekülen^[132,139] und Polymeren^[140] oder für die Koordination von Metallen verwendet. Auch in der Glycobiologie fanden hydroxylierte Oberflächen Verwendung, um Mono- oder Oligosaccharide zu immobilisieren und so Kohlenhydrat-Mikroarrays darzustellen.^[141–149]

Die Verknüpfung von Moleküle auf den hydroxylierten Oberflächen erfolgt über Silane, die über Oberflächen-aktive Gruppen verfügen, welche über Silizium-Sauerstoff-Bindungen an die Oberfläche binden. Bei der Oberflächen-aktiven Gruppe handelt es sich meist um Alkyltrichloro-,^[150] Alkyltrimethoxy- oder Alkyltriethoxy-Silane.^[122,151] Vor der Anwendung wird die Oberfläche gereinigt und aktiviert, um die Anzahl der Hydroxygruppen auf der Oberfläche zu maximieren.^[127,152] Für eine vollständige Ausbildung geordneter Monolagen ist außerdem der Wassergehalt während der Reaktion entscheidend. Bei Abwesenheit von Wasser sind die gebildeten Monolagen unvollständig. Ist der Wassergehalt andererseits zu hoch, kommt es zur Polymerisation der eingesetzten Silane.^[122] Die Ordnung der gebildeten Monolagen ist ferner abhängig von der Länge der

Alkylketten in den immobilisierten Molekülen. Je länger die verwendeten Alkylketten, desto größer die Ordnung.

Sind die entsprechenden Silane mit einer funktionellen Gruppe terminiert, so ist es möglich, funktionale Oberflächen herzustellen, welche beispielsweise andere Moleküle kovalent oder nicht-kovalent binden können. Durch Verwendung von Silangemischen mit unterschiedlicher Kopfgruppe ist es gelungen, orthogonal funktionalisierbare, bifunktionale Silan-Oberflächen herzustellen.^[153,154]

Die in Abschnitt 3.2 für Metalloberflächen beschriebenen Methoden zur Oberflächencharakterisierung können auch für hydroxylierte Oberflächen verwendet werden. Zusätzlich zu diesen Charakterisierungsmethoden können bei Verwendung von Glasoberflächen auch optische Methoden eingesetzt werden. So ist es möglich, SAMs, die aus UV-aktiven Substanzen gebildet wurden, bei entsprechender Durchlässigkeit des Glases, UV-spektroskopisch zu untersuchen.^[155,156] Die *cis-trans*-Isomerie von Azobenzol-Monolagen auf Siliziumoxid-Substraten konnte beispielsweise UV-spektroskopisch verfolgt werden.^[157-161] Im Rahmen dieser Arbeit soll die UV-Spektroskopie dazu genutzt werden, Oberflächen-gebundene Glycothymidin-Derivate und deren photoinduzierte Dimerisierung auf der Oberfläche nachzuweisen.

Ein direkter Nachweis der Dimerisierung von immobilisierten Glycothymidin-Derivaten auf Polystyroloberflächen war, wie bereits erwähnt, aufgrund der störenden Eigenschaften des Polystyrols gegenüber vielen analytischen Methoden nicht möglich. Bei der Verwendung von Glas als Oberfläche für eine Immobilisierung der Glycothymidine kann, im Gegensatz zu Oberflächen aus Polystyrol oder Gold, eine UV-spektroskopische Untersuchung erfolgen und so im Idealfall der Nachweis für die Photodimerisierung der immobilisierten Thymineinheiten erbracht werden. Das Absorptionsmaximum von Thymin liegt bei etwa 267 nm. Diese Bande geht infolge der Dimerisierung zurück, während gleichzeitig eine UV-Bande bei etwa 240 nm entsteht, welche charakteristisch für den Cyclobutanring ist. Um diesen Vorgang auf der Oberfläche UV-spektroskopisch verfolgen zu können ist es nötig, eine Oberfläche zu verwenden, die im entsprechenden Wellenlängenbereich UV-durchlässig ist. Die Durchlässigkeit von Quarzglas fängt bei einer Wellenlänge von etwa 170 nm an. Dieses

ist daher besonders geeignet für den Nachweis einer Thymin-Dimerisierung auf der Oberfläche.

Um die Glycothymidine auf der Quarzoberfläche verankern zu können, müssen diese zunächst mit entsprechenden funktionellen Gruppen ausgestattet werden. Die Oberflächenchemie stellt ein wichtiges Werkzeug bei der Darstellung verschiedener SAMs mit einer Vielseitigkeit an funktionellen Gruppen dar.^[162] Für eine effektive Immobilisierung wurden Reaktionen gewählt, die mit möglichst hoher Ausbeute ablaufen und stereoselektiv zum gewünschten Produkt führen. Hier erwiesen sich die sogenannten „Click-Reaktionen“ als besonders geeignet. Diese Reaktionen wurden kürzlich von SHARPLESS et al. populär gemacht. Dabei wurde argumentiert, dass sich neue Substanzen, dem Beispiel der Natur folgend, durch die Verknüpfung kleiner Einheiten über die Ausbildung irreversibler Heteroatom-Bindungen leicht synthetisieren lassen. Die Reaktionen sollten hohe Ausbeuten liefern, dabei nur leicht zu entfernende Nebenprodukte zulassen und unter milden Bedingungen selektiv reagieren. Das Lösungsmittel sollte ebenfalls leicht zu entfernen und das Produkt gut zu isolieren sein. Reaktionen, die diesen Ansprüchen genügten, wie zum Beispiel die Michael-Addition und Diels-Alder-Reaktionen, wurden als „Click-Chemie“ bezeichnet.^[163–165] Da sich Thioharnstoff- und Peptidkupplungen sowie die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen und Aziden in Lösung als besonders zuverlässig erwiesen, wurden diese drei Reaktionen für die Immobilisierung der Glycothymidin-Derivate auf Quarzglas gewählt. Die Glasoberflächen sollten also mit folgenden funktionellen Gruppen ausgestattet werden:

- Amine für eine Thioharnstoffkupplung mit Glycothymidin-Isothiocyanaten
- Azide für eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit Propargyl-Glycothymidinen
- Aktivester für eine Peptidkupplung mit Aminoglycothymidinen

K. SCHWEKENDIEK hat bereits erste Versuche der Glycothymidin-Immobilisierung auf Quarzglas unternommen. Im Fall der Thioharnstoffkupplung konnte bislang jedoch kein Nachweis der Immobilisierung erbracht werden. Über die 1,3-dipolare Cycloaddition hingegen konnten Propargyl-Glycothymidine nachweislich auf die Oberfläche

immobilisiert werden. Ein Nachweis der Dimerisierung auf Quarzoberflächen ist bisher nicht erfolgt.^[97]

In den folgenden Abschnitten werden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Funktionalisierungen der Quarz-Substrate und die drei erwähnten Reaktionen zur Glycothymidin-Funktionalisierung der Oberfläche beschrieben.

3.3.1 Funktionalisierung der Quarzoberfläche durch Thioharnstoff-Kupplung

Synthesen und Bestrahlung des Isothiocyanats

In Kooperation mit B. WATERKOTTE aus der Arbeitsgruppe K. SCHMITZ am Karlsruher Institut für Technologie sollten Glycothymidin-Derivate auf Aminopropyltrimethoxysilan(APTMS)-funktionalisierte Quarzoberflächen immobilisiert werden. Für die Verknüpfung mit der Aminogruppe des Aminopropyltrimethoxysilans bot sich das leicht zugängliche Isothiocyanatoglycothymidin **29** an, welches in einer Stufe aus dem bereits entschützten Azidoglycothymidin **20** dargestellt werden konnte (Abbildung 44).

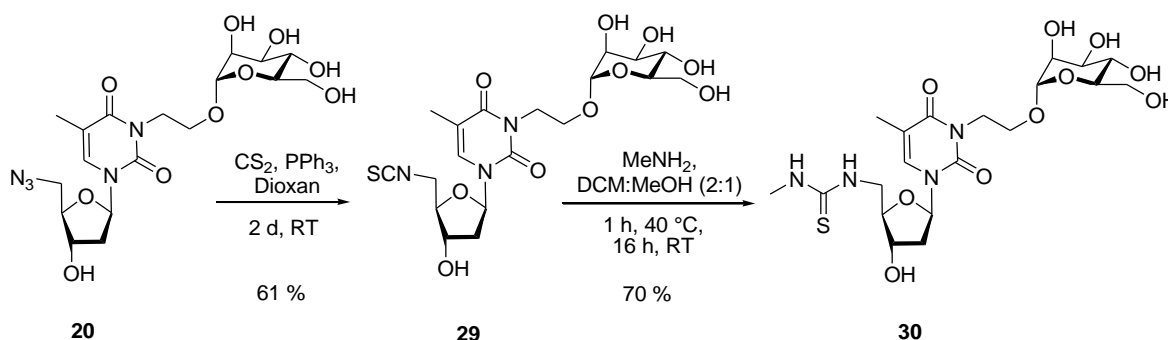


Abbildung 44: Darstellung des Isothiocyanatoglycothymidins **29** aus dem Azidoglycothymidin **20** und anschließende Thioharnstoffkupplung von **29** mit Methylamin.

Das Isothiocyanat **29** kann in einer Thioharnstoffkupplung auf das Aminofunktionalisierte Quarzglas immobilisiert werden. Als Vorbereitung auf die Oberflächenchemie wurde die Reaktion am Isothiocyanat **29** zunächst in Lösung untersucht. Dafür wurde **29** mit Methylamin zum denkbar einfachsten Thioharnstoffderivat **30** umgesetzt. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen wurde in diesem Reaktionsschritt neben dem üblicherweise für Thioharnstoff-Kupplungen

verwendeten Dichlormethan zusätzlich Methanol zugesetzt. Doch trotz guter Löslichkeit in dem Reaktionsgemisch verlief die für gewöhnlich quantitativ ablaufende Reaktion lediglich mit einer Ausbeute von 70 % (Abbildung 44). Bei Verwendung von Dimethylformamid als Lösungsmittel konnte die Ausbeute immerhin auf 80 % gesteigert werden. Für die Reaktionen auf der Oberfläche wurde daher Dimethylformamid verwendet.

Die Dimerisierung des Isothiocyanats **29** in Lösung wurde durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm in Wasser mit Aceton als Triplettensensitizer erreicht (Abbildung 45).

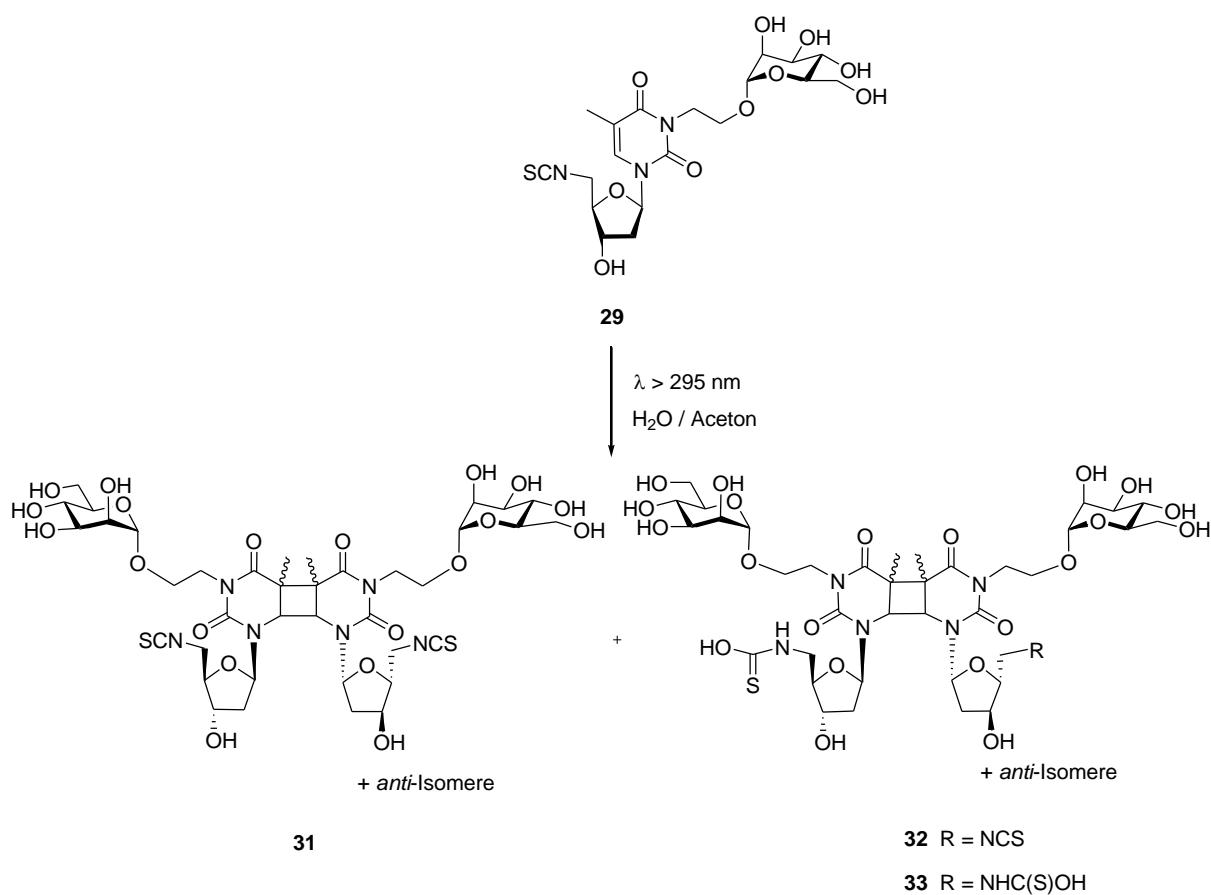


Abbildung 45: Eine Bestrahlung des Isothiocyanats **29** liefert neben dem Dimer **31** das Produktgemisch aus **32** und **33**, welches sich aus der Reaktion der Isothiocyanatgruppe mit Wasser ergibt.

Neben dem erwarteten Diisothiocyanat **31** wurde ein Gemisch aus Dimerisierungsprodukten mit nicht mehr intakter Isothiocyanatfunktion erhalten, die durch Hydrolyse

von einer oder beiden Isothiocyanatfunktionalitäten entstehen. Das Produktgemisch konnte mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert werden. Aufgrund ähnlicher Masse und Polarität der entstandenen Verbindungen konnten diese jedoch nicht separiert werden. Daher war das Dimer für eine Immobilisierung auf der Oberfläche nicht in reiner Form zugänglich.

Immobilisierung und Oberflächen-Charakterisierung

Für die Immobilisierung der Glycothymidine durch Thioharnstoffkupplung an Amino-terminierte Quarzglasoberflächen, musste zunächst die Glasoberfläche mit Aminopropyltrimethoxysilan beschichtet werden. Diese Funktionalisierung der Oberfläche wurde von B. WATERKOTTE durchgeführt. Der Erfolg der Oberflächenfunktionalisierung konnte mit Hilfe einer Testreaktion nachgewiesen werden. Dazu wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an die Amino-terminierten Quarzgläser gekuppelt. Der Erfolg dieses Kupplungsschrittes konnte durch Fluoreszenzreadout nachgewiesen werden (Abbildung 46).

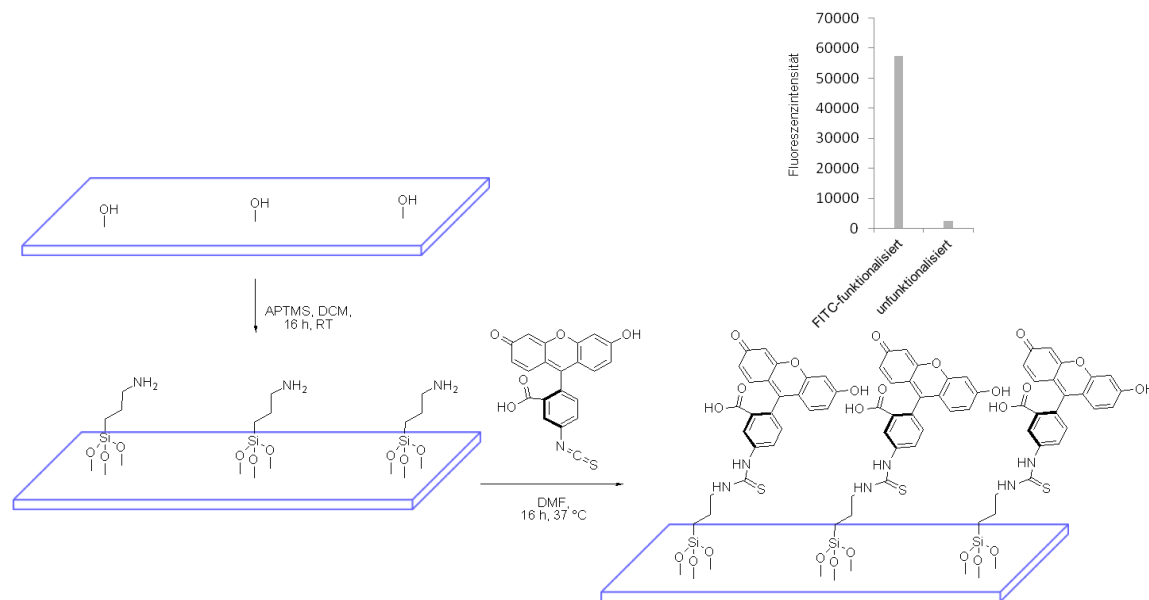


Abbildung 46: Funktionalisierung von Quarzoberflächen. Die hydroxylierte Oberfläche wurde zunächst mit Aminopropyltrimethoxysilan funktionalisiert. Anschließend wurde der Erfolg der Funktionalisierung durch Kupplung mit FITC und Fluoreszenzmessung der funktionalisierten Gläser belegt.

Durch die SAM-Bildung wird das Benetzungsverhalten von Oberflächen beeinflusst. Daher konnte die erfolgreiche Immobilisierung des Fluoresceinisothiocyanats auch durch Bestimmung des Kontaktwinkels vor und nach der Immobilisierung belegt werden. Kontaktwinkelmessungen liefern Informationen über das Benetzungsverhalten von Oberflächen. Je nach Funktionalisierung ergeben sich für hydrophile Oberflächen kleinere und für hydrophobe Oberflächen größere Kontaktwinkel. Während der Kontaktwinkel der unfunktionalisierten Oberfläche 12.01° beträgt, liegt der Kontaktwinkel des mit FITC beschichteten Glases bei 55.07° (Abbildung 47).

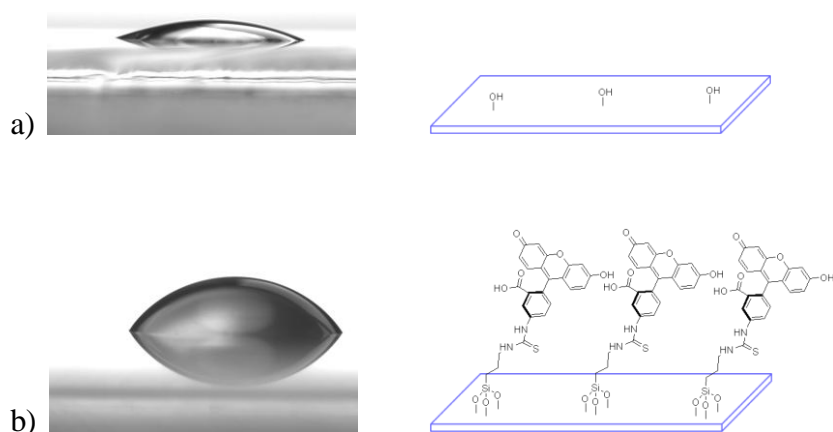


Abbildung 47: Kontaktwinkelaufnahmen einer gereinigten, unfunktionalisierten Oberfläche: 12.01° (a) und einer FITC-terminierten Oberfläche: 55.07° (b).

Auch UV-spektroskopische Untersuchungen der Quarzsubstrate belegten den Erfolg der Immobilisierung (Abbildung 48). Das Absorptionsmaximum des immobilisierten Fluoresceinisothiocyanats ist bei einer Wellenlänge von ~ 500 nm zu sehen.

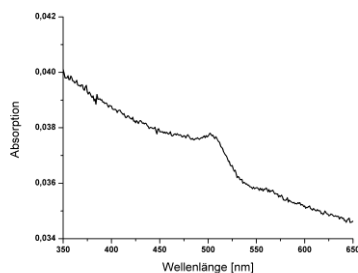


Abbildung 48: UV-Absorptionsspektrum von auf Quarzglas immobilisiertem FITC zeigt die charakteristische Absorption bei einer Wellenlänge von ~ 500 nm.

Die Intensität der Absorptionsbande ist jedoch sehr schwach. Wird angenommen, dass das Lambert-Beersche-Gesetz (Formel (3.1)) auch für absorbierende Substanzen im immobilisierten Zustand gilt, so kann die geringe Intensität des Absorptionsmaximums durch die geringe Stoffmengenkonzentration auf der Oberfläche erklärt werden. Auf der Quarzoberfläche befindet sich nur eine geringe Menge der zu vermessenden Substanz (im Idealfall nur eine Monolage). Sowohl die Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz als auch die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers sind dementsprechend gering. Nach Formel (3.1) muss daher auch die Absorption gering sein.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * c * d \quad (3.1)$$

Die Immobilisierung des Isothiocyanats **29** (Abbildung 49) wurde unter denselben Reaktionsbedingungen durchgeführt wie die Testreaktion mit dem FITC.

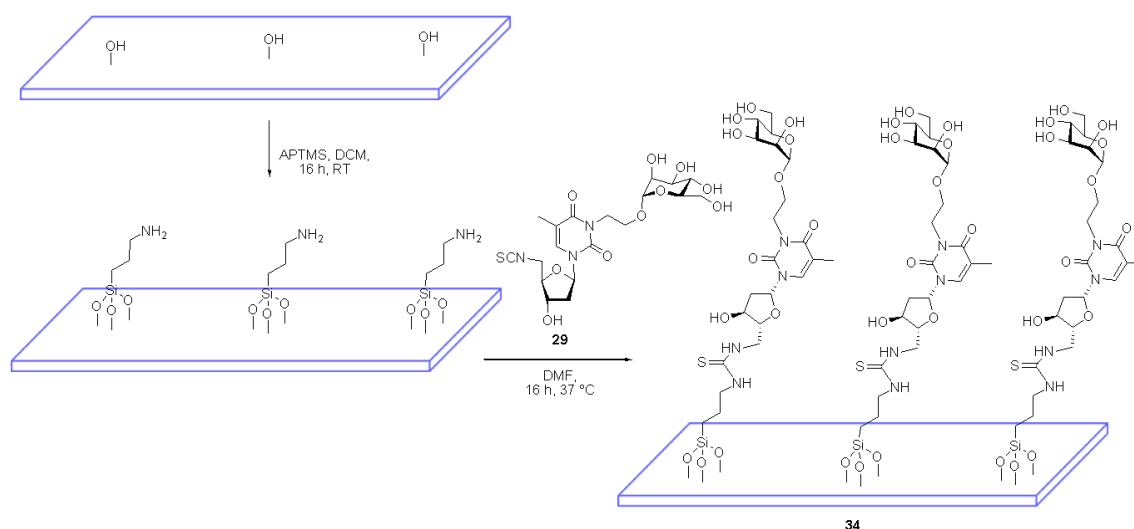


Abbildung 49: Funktionalisierung der Quarzoberfläche mit Aminopropyltrimethoxysilan führt zu Amino-terminierten Oberflächen, welche durch Thioharnstoffkupplung auf der Oberfläche mit dem Isothiocyanat **29 reagieren können.**

Das so immobilisierte Isothiocyanat **29** konnte jedoch nicht UV-spektroskopisch auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen auf einen geringeren Absorptionskoeffizienten des Isothiocyanats **29** im Vergleich zum FITC zurückzuführen sein. Zum anderen könnte eine unvollständige Thioharnstoff-Kupplung zu einer geringeren Belegung und damit nicht mehr detektierbaren Intensität des Absorptionsmaximums führen. Ein aus der Literatur bekanntes Problem bei der Bildung aminosilylierter SAMs ist die Säure-Base-Interaktion zwischen der Aminogruppe des

Silans und der Silanolgruppe der Oberfläche. Dies führt dazu, dass das Amin für weitere Reaktionen auf der Oberfläche nicht mehr verfügbar ist. [166–168]

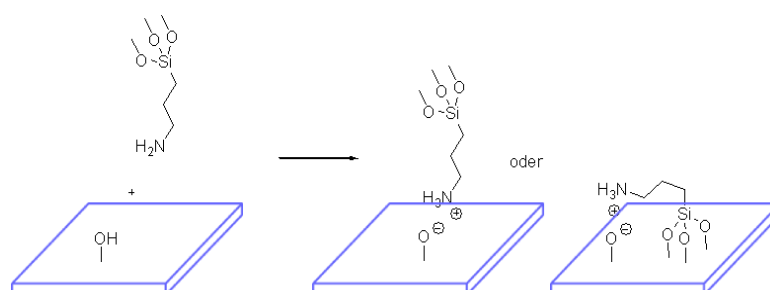


Abbildung 50: Bei der Bildung aminosilylierter SAMs kommt es zur Säure-Base-Interaktion zwischen der Aminogruppe des Silans und der Silanolgruppe der Oberfläche.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde dazu übergegangen, die Thioharnstoffkupplung zwischen dem Isothiocyanat **29** und dem Aminopropyltrimethoxysilan in Lösung durchzuführen. Das so erhaltene Glycothymidinyl-Silan **35** konnte auf diesem Wege auf der Oberfläche immobilisiert und so problemlos das Glycothymidin-funktionalisierte Quarz-Substrat **34** erhalten werden (Abbildung 51).

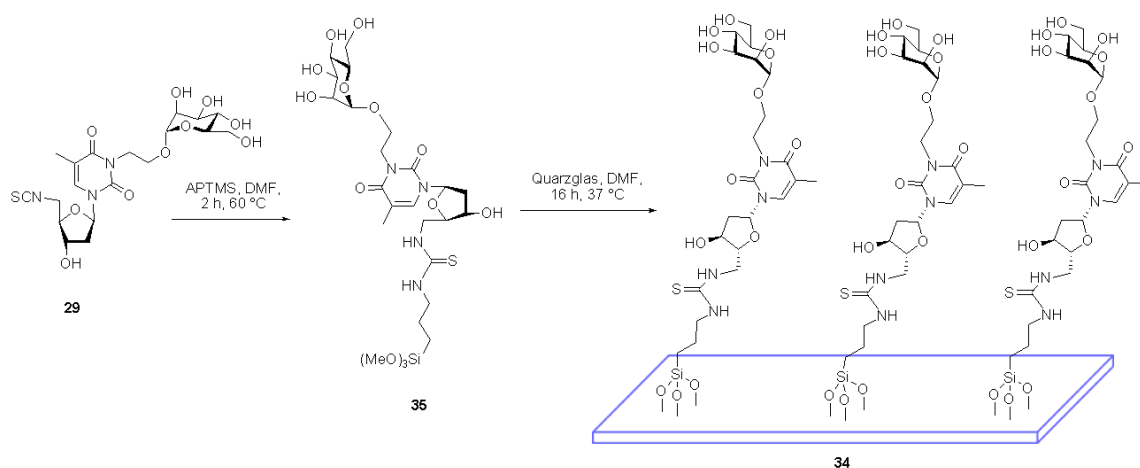


Abbildung 51: Thioharnstoffkupplung von Isothiocyanat **29** und Aminopropyltrimethoxysilan in Lösung und anschließende Immobilisierung des so erhaltenen Silans **35** auf Quarzoberflächen ermöglichten schließlich die Darstellung von **34**.

Der Nachweis der Funktionalisierung auf der Oberfläche konnte in diesem Fall sowohl unter Zuhilfenahme von Kontaktwinkelmessungen als auch UV-spektroskopisch erbracht werden. Mittels Kontaktwinkelmessungen war auch bei Verwendung von Thymidin-Lösungen mit einer Konzentration von 0.02 mM noch ein Nachweis der

Funktionalisierung möglich. Abbildung 52 zeigt die Kontaktwinkelaufnahme im Vergleich mit der Aufnahme einer unfunktionalisierten Oberfläche.

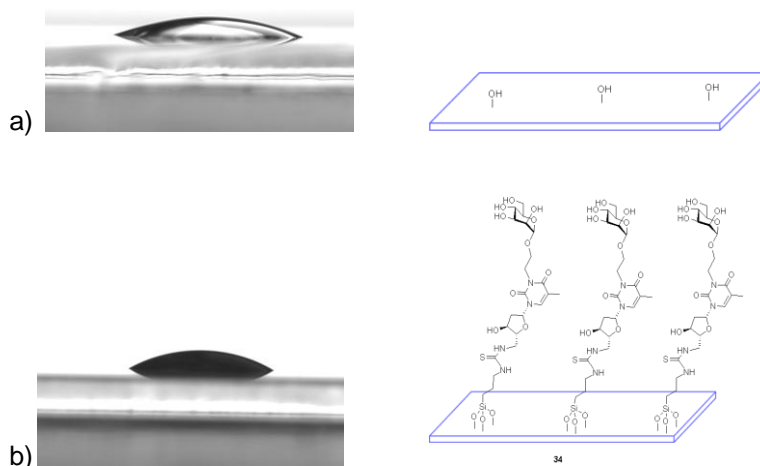


Abbildung 52: Kontaktwinkelmessungen ergaben a) 12.01° für unfunktionalisiertes Glas; b) 32.69° für Glycothymidin-funktionalisiertes Glas 34.

In Abbildung 54 ist das UV-Spektrum des immobilisierten Glycothymidins **29** gezeigt. Hier ist deutlich das Absorptionsmaximum von Thymin bei ~ 267 nm zu sehen, was eine erfolgreiche Immobilisierung belegt. Dieser UV-Nachweis ist für Konzentrationen von > 0.2 mM der zur Immobilisierung verwendeten Thymidin-Lösungen praktikabel. Bei einer Konzentration von 0.2 mM der zur Immobilisierung eingesetzten Lösung ist aufgrund der niedrigen Thymidin-Konzentration auf der Oberfläche keine UV-Absorption mehr messbar.

Ziel war es nun, die Dimerisierung der Thymineinheiten auf der Oberfläche **34** in Folge einer Bestrahlung nachzuweisen. Dazu wurden die Glycothymidin-funktionalisierten Oberflächen einer Bestrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm ausgesetzt (Abbildung 53). Laut Literatur^[74] findet die Dimerisierung von Thymin in immobilisierter Form aus dem Singulettzustand statt, so dass hier auf den Triplettensensitizer verzichtet werden kann.

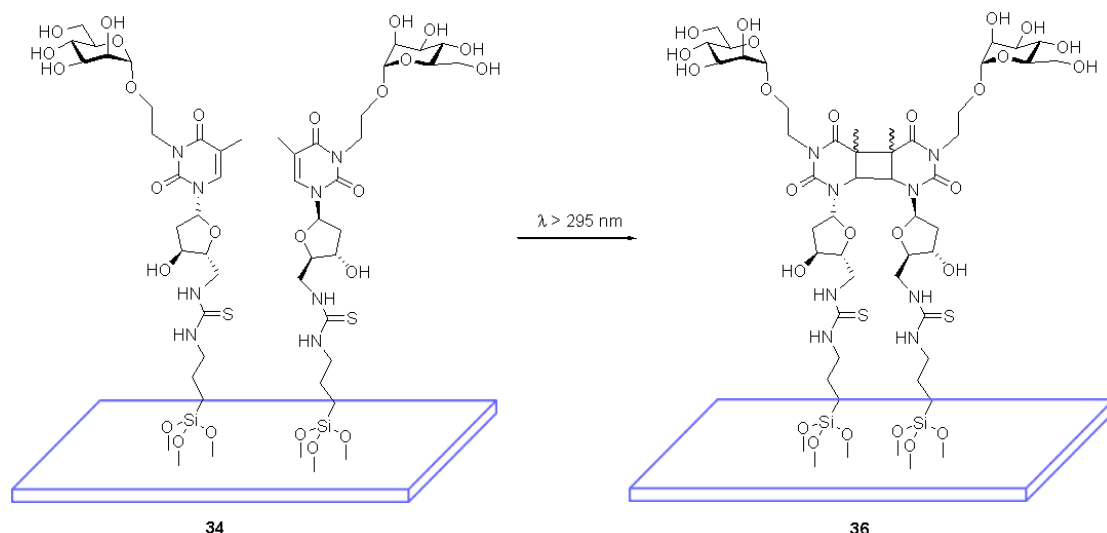


Abbildung 53: Bestrahlung der funktionalisierten Oberfläche mit einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm führt zur Dimerisierung der immobilisierten Thymineinheiten.

UV-spektroskopische Untersuchungen der Oberflächen **34** und **36** zeigen, dass infolge der Belichtung auf der Oberfläche ein Rückgang der Thymin-spezifischen Absorptionsbande bei 267 nm zu beobachten ist (Abbildung 54). Gleichzeitig ist bei 240 nm die Entstehung des Absorptionsmaximums des Cyclobutans zu erkennen, dies belegt die Cyclisierung der Thymin-Einheiten auf der Oberfläche **36**. Damit ist es erstmals gelungen, die photoinduzierte Dimerisierung der Glycothymidine auf einer Oberfläche nachzuweisen.

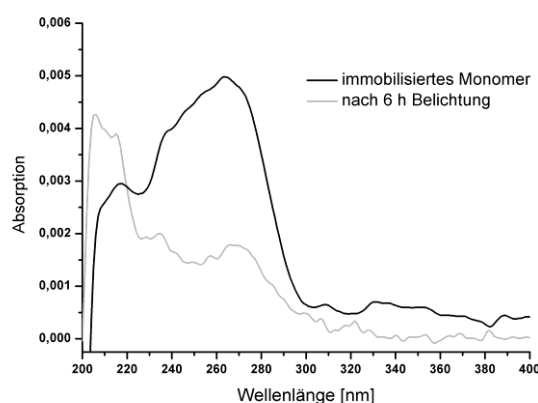


Abbildung 54: UV-Spektrum des immobilisierten Isothiocyanatglycothymidins **29** auf einer Quarzoberfläche: bei etwa 267 nm ist deutlich das für Thyminverbindungen typische Absorptionsmaximum zu sehen (schwarz), welches infolge einer Belichtung bei Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm stark zurückgeht (grau).

Ferner konnte bestätigt werden, dass für die Dimerisierung von immobilisiertem Thymin kein Tripletsensitizer benötigt wird. Da es für Studien bakterieller Adhäsion an Glycothymidinen entscheidend ist über Kenntnisse der molekularen Zusammenhänge auf der Oberfläche zu verfügen, erweist sich Quarzglas aufgrund seiner Zugänglichkeit für optische Charakterisierungsmethoden als besonders wertvoll für diese Zwecke.

Variation der Kettenlänge

Die Thioharnstoffkupplung des Isothiocyanats **29** mit Aminopropyltrimethoxysilan in Lösung hat die Darstellung einer dimerisierbaren Glycothymidin-Oberfläche ermöglicht. Mit Hilfe dieser Oberfläche ist es nun möglich den Einfluss der Dimerisierung auf die bakterielle Adhäsion an die entsprechende Oberfläche zu untersuchen. Die Genauigkeit der hierbei erzielten Ergebnisse kann durch gezielte Optimierungen am bestehenden System verbessert werden. Ein variabler Faktor in diesem System ist die Spacerlänge des eingesetzten Moleküls. Aminofunktionalisierte Alkylsilane sind in verschiedenen Kettenlängen erhältlich. Daher konnte mit Aminoundecyltrimethoxysilan (AUTMS) leicht eine wesentlich hydrophobere Glycothymidin-funktionalisierte Oberfläche hergestellt werden im Vergleich zu **34**. Für die Immobilisierung wurde Isothiocyanat **29** in Lösung mit dem AUTMS zur Reaktion gebracht. Das gereinigte Quarzsubstrat wurde mit einer 30 mM-Lösung des so erhaltenen Silans **37** in DMF über Nacht inkubiert (Abbildung 55).

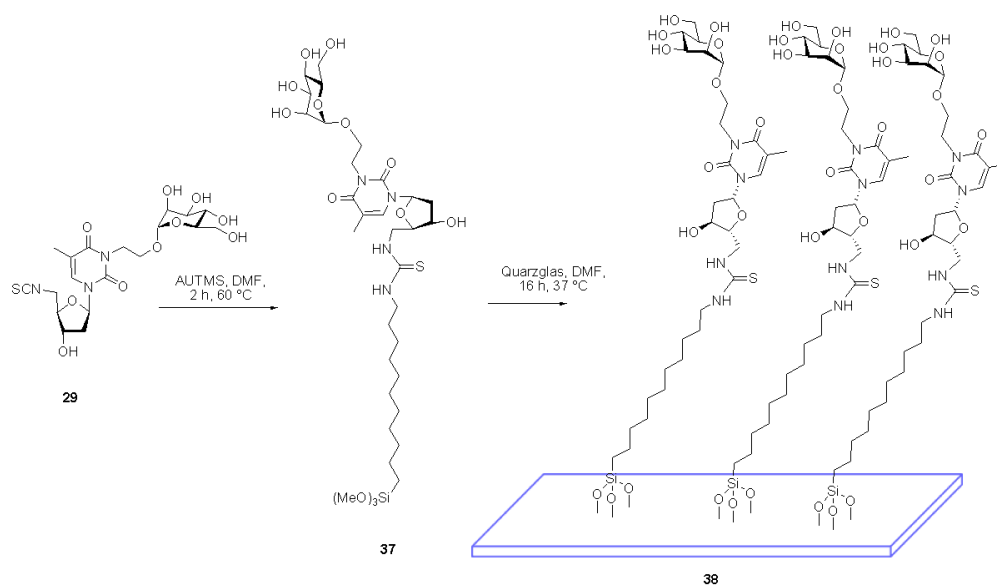


Abbildung 55: Thioharnstoffkupplung von Isothiocyanat **29** mit Aminoundecyltrimethoxysilan und anschließende Immobilisierung von **37** auf Quarzglas führten zu der hydrophoben Oberfläche **38**.

Kontaktwinkelmessungen mit der Oberfläche **38** ergaben einen Winkel von 73.18° und belegen damit die Hydrophobizität der funktionalisierten Oberfläche gegenüber der hydrophilen unfunktionalisierten Oberfläche (Abbildung 56).

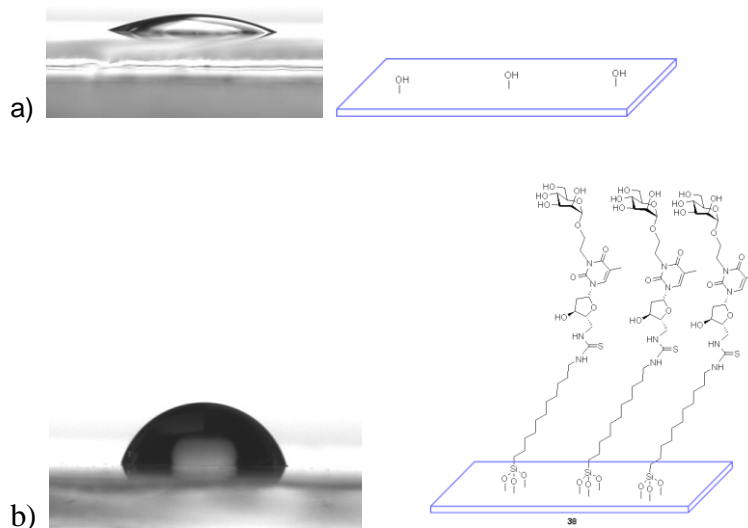


Abbildung 56: Der Kontaktwinkel beträgt 12.01° für unfunktionalisiertes Glas (a) und 73.18° für Glycothymidin-funktionalisiertes Glas (b).

Auch hier war ein UV-spektroskopischer Nachweis der Immobilisierung möglich. In Abbildung 57 ist deutlich das für Thymin spezifische Absorptionsmaximum bei 267 nm zu sehen.

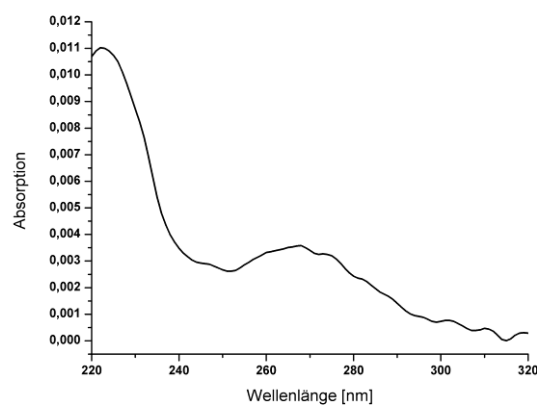


Abbildung 57: Das UV-Spektrum der hydrophoben Glycothymidin-funktionalisierten Quarzoberfläche **38** zeigt bei 267 nm ein deutliches Absorptionsmaximum und belegt damit die erfolgreiche Funktionalisierung.

Es konnte also gezeigt werden, dass Organosilanverbindungen unterschiedlicher Kettenlänge für die Verknüpfung mit dem Glycothymidin mittels Thioharnstoffkupplung geeignet sind und sich so Glycothymidin-funktionalisierte Oberflächen unterschiedlicher Hydrophobizität darstellen lassen. Die mit Aminoundecyltrimethoxysilan funktionalisierte Oberfläche steht nun ebenfalls für Studien der bakteriellen Adhäsion in Abhängigkeit des Dimerisierungszustandes auf der Oberfläche zur Verfügung.

GFP-Assay auf Quarzglas

Erste Adhäsionsstudien wurden mit den über Aminopropyltrimethoxysilan funktionalisierten Oberflächen **34** durchgeführt. Die Glycothymidin-funktionalisierten Oberflächen **34** wurden dazu in einem Adhäsions-Assay mit fluoreszenzmarkierten *E. coli*-Bakterien inkubiert. Ziel dieses Assays war die Untersuchung der bakteriellen Adhäsion an die immobilisierten Glycothymidin-Oberflächen. Hierbei stand die Fragestellung im Vordergrund, ob die bakterielle Adhäsion sich infolge der Thymin-Dimerisierung auf der Oberfläche ändert. Um Antworten auf diese Frage zu finden, wurde zunächst die Hälfte der funktionalisierten Oberflächen 6 h mit einer Quecksilber-Mitteldrucklampe bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm bestrahlt. Als Kontrolle wurde auch die Hälfte der unfunktionalisierten Quarzsubstrate, die im Adhäsionsassay als Blindprobe verwendet werden, bestrahlt. Sowohl die belichteten als auch die unbelichteten Oberflächen wurden nun für 90 min. mit den GFP-markierten *E. coli*-Bakterien inkubiert. Auf eine vorherige BSA-Blockierung der Glasoberfläche konnte verzichtet werden, da Bakterien auf Glas- oder Metalloberflächen nicht so bereitwillig adhäreren wie auf hydrophoben Oberflächen.^[169] Nach der Inkubationszeit wurde die Oberfläche in drei Waschschritten mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend die Anzahl der Oberflächen-gebundenen Bakterien durch Fluoreszenzauslesung quantifiziert. Die angegebenen Fluoreszenzintensitäten ergeben sich aus den gemessenen Fluoreszenzwerten abzüglich der für die Blindprobe erhaltenen Werte. Die Grundfluoreszenz der zur Kontrolle mitbelichteten unfunktionalisierten Substrate unterschied sich nicht von den Werten der unbelichteten Gläser.

Wurde für die Immobilisierung des Glycothymidins auf der Quarzoberfläche eine 1.0 mM Glycothymidin-Lösung verwendet, so zeigte sich kein Unterschied in der bakteriellen Adhäsion an belichtete und unbelichtete Oberflächen. Wurden hingegen Lösungen mit

einer Konzentration von ≤ 0.2 mM verwendet, so war ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Für Konzentrationen ≤ 0.2 mM nimmt die bakterielle Adhäsion infolge der Belichtung ab (Abbildung 58).

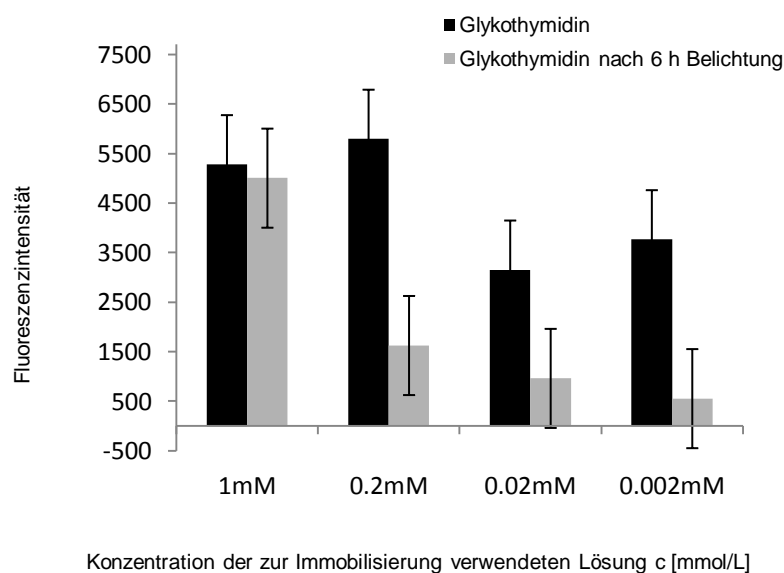


Abbildung 58: Die Quantifizierung der Oberflächen-gebundenen Bakterien an die unbelichtete (schwarz) und belichtete (grau) Glycothymidin-Oberflächen erfolgte durch Fluoreszenzreadout.

Der signifikante Unterschied in der bakteriellen Adhäsion tritt in einem Konzentrationsbereich auf, der bisher aufgrund zu geringer Thymidinkonzentration nicht UV-spektroskopisch untersucht werden konnte. Die Dimerisierung der immobilisierten Glycothymidinderivate ist in diesem Konzentrationsbereich nicht nachgewiesen, daher lässt sich dieser Effekt nur schwer deuten. Es könnte bedeuten, dass sich infolge der Dimerisierung auf der Oberfläche (sofern diese stattgefunden hat) die Konformation der exponierten Liganden insofern verändert, dass die bakterielle Adhäsion abnimmt. Um diesen Effekt jedoch eindeutig interpretieren zu können, bedarf es weiterer Oberflächencharakterisierung in dem relevanten Konzentrationsbereich. Wie bereits erwähnt (Abschnitt 3.2) ist für eine vollständige Charakterisierung von SAMs die Kombination verschiedener Methoden nötig. Möglicherweise könnten hier die Rastertunnelmikroskopie und die Rasterkraftmikroskopie durch Vergleich der Oberflächentopologie vor und nach der Belichtung Aufschluss geben.

ZUSAMMENFASSUNG: SYNTHESE VON ISOTHIOCYANATOTHYMIDIN **29** UND IMMOBILISIERUNG AUF QUARZGLAS

Eine direkte Immobilisierung des leicht zugänglichen Isothiocyanats **29** auf Amino-terminierte Oberflächen konnte nicht in nachweisbarem Maße durchgeführt werden. Nach vorheriger Thioharnstoff-Kupplung von **29** mit Aminopropyltrimethoxysilan in Lösung war es jedoch möglich, die Funktionalisierung der Oberfläche **34** UV-spektroskopisch und mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen nachzuweisen. Auf diese Weise ist es gelungen, Glycothymidin-Oberflächen auf Quarzglas darzustellen. Die Photodimerisierung auf der Oberfläche konnte für Konzentrationen von $> 0.2\text{mM}$ der verwendeten Glycothymidinlösung mit Hilfe der UV-Spektroskopie verfolgt werden. Somit ist es erstmals gelungen die Dimerisierung der immobilisierten Glycothymidine zu belegen.

Ferner konnten über die Funktionalisierung mit Aminoundecyltrimethoxysilan Glycothymidin-SAMs mit längerer Alkylkette dargestellt und die Immobilisierung UV-spektroskopisch nachgewiesen werden.

Erste Versuche bakterieller Adhäsion an die gebildeten Glycothymidin-Oberflächen **34** und **35** konnten durchgeführt werden. Hier zeigte sich, dass für den Konzentrationsbereich zwischen 0.2 mM und 0.002 mM die bakterielle Adhäsion infolge der Belichtung abnimmt.

3.3.2 Funktionalisierung der Oberfläche mit Hilfe der „Click-Chemie“

Neben der Thioharnstoff-Kupplung stand eine weitere Reaktion aus dem Bereich der „Click-Chemie“ für die Funktionalisierung der Oberfläche zur Verfügung: die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen. Die thermisch induzierte Reaktion liefert die beiden regioisomeren Produkte, das 1,4- und das 1,5-Triazol, in einem ca. 1:1-Gemisch. Die von SHARPLESS^[163] und MELDAL^[170] 2002 zeitgleich publizierte Kupfer-(I)-Katalyse ergab bei beschleunigter Reaktion und nahezu kompletter Umsetzung regioselektiv das 1,4-Triazol. Diese Verbesserung der Reaktion machte die bereits bekannte HUISGEN-Cycloaddition zur „nahezu perfekten“ Reaktion und damit zum Prototyp einer „Click-Reaktion“.^[164,165,170–172] Daher eignet sich die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden besonders für die Anwendung auf Oberflächen.^[173,174] Unter Verwendung des 11-Azidoundecyltrimethoxysilans (**39**) wurde eine Azid-terminierte Quarzglasoberfläche hergestellt (Abbildung 59). Dazu wurde das Azidosilan **39** in Dichlormethan gelöst und das Quarzsubstrat über Nacht bei 37 °C in der Lösung inkubiert. Die Funktionalisierung wurde mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen nachgewiesen.

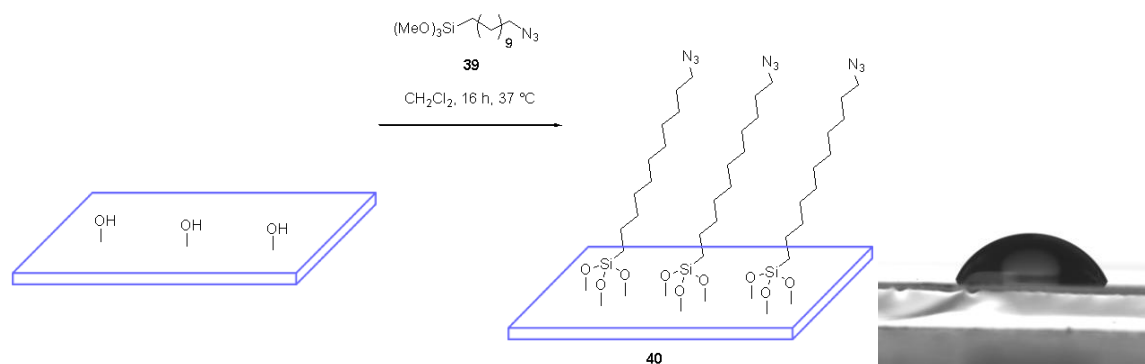


Abbildung 59: Darstellung der Azid-terminierten Quarzoberfläche **40** durch Inkubation mit 11-Azidoundecyltrimethoxysilan (**39**) und Nachweis der Funktionalisierung durch Kontaktwinkelmessung (66.58°).

Um das Glycothymidin-Derivat mit der Azid-terminierten Oberfläche zur Reaktion zu bringen, musste zunächst eine Alkingruppe eingeführt werden. Dies geschah unter Verwendung der entsprechenden Schutzgruppenstrategie an 3'-Position der Ribose (Abbildung 60). Ausgehend von 2'-Desoxythymidin (**5**) wurde nach selektiver TBDMS-Schützung der 5'-Hydroxygruppe,^[113] die 3'-Hydroxygruppe in einer Williamson-Ethersynthese mit dem Propargylbromid umgesetzt. Das Alkin **42** wurde in

57 %iger Ausbeute erhalten. Nach anschließender TBDMS-Entschützung wurde das Mannosederivat **18** ebenfalls in einer Williamson-Ethersynthese in Position N^3 in die Thyminbase eingeführt. Die Steuerung der Regioselektivität übernimmt in diesem Fall das Lösungsmittel (Abschnitt 3.6). Das Glycothymidin-Derivat **44** wurde mit 65 % Ausbeute erhalten und konnte nach Entschützung unter ZEMPLÉN-Bedingungen^[110] für die Immobilisierung verwendet werden.

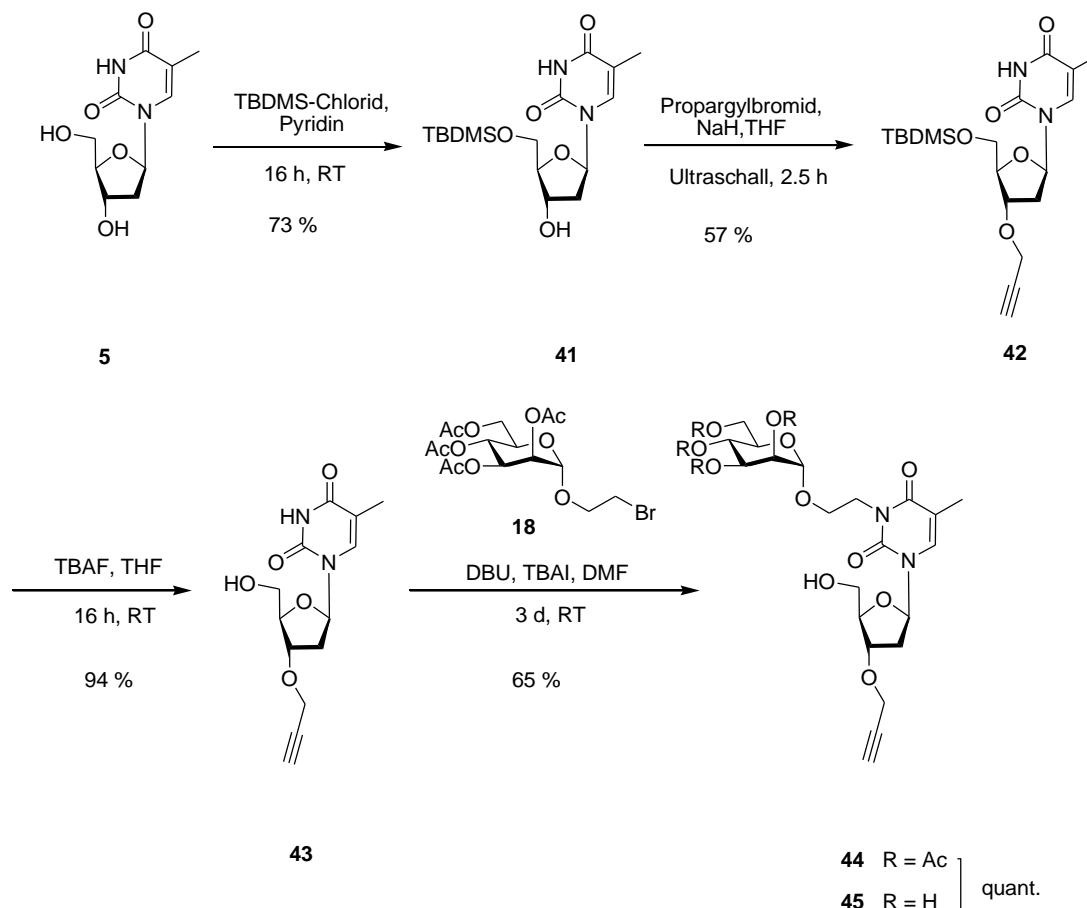
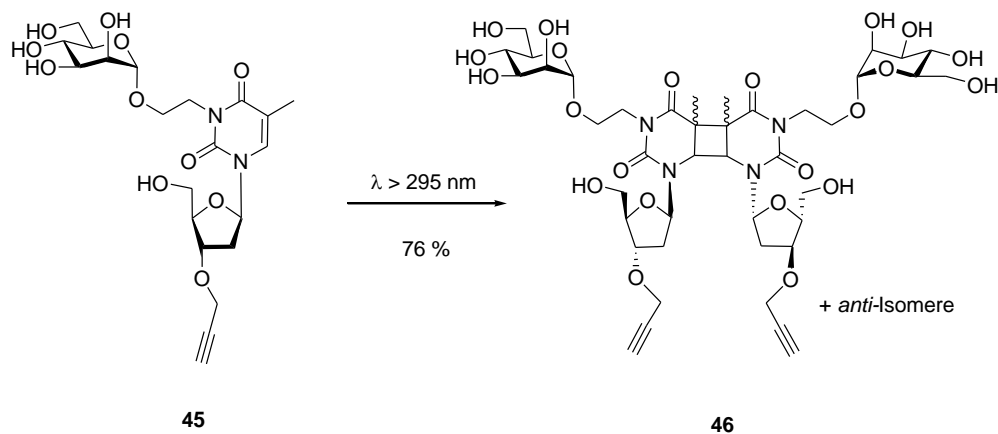


Abbildung 60: Synthese des 3'-Propargyl-Glycothymidins **45** ausgehend von 2'-Desoxythymidin (**5**) in 5 Stufen.

Vor der Immobilisierung wurde zunächst die photoinduzierte Dimerisierung des Propargyl-Glycothymidins **44** in Lösung getestet. Hier wurden neben dem erwarteten Glycothymidin-Dimer **46** weitere dimere Strukturen des Glycothymidins **45** erhalten (Abbildung 61). NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Aufnahmen deuten auf eine lichtinduzierte Reaktion des Alkins hin. Auf Grundlage der detektierten Massen können die in Abbildung 61 dargestellten Strukturen als Nebenprodukte vorgeschlagen werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse spielen bei der Photodimerisierung auf der

Oberfläche allerdings keine Rolle, da das Alkin nach der „Click-Reaktion“ auf der Azid-terminierten Oberfläche nicht mehr verfügbar ist und somit nicht an der photoinduzierten Reaktion teilnehmen kann.



aufgrund der massenspektrometrischen Analytik angenommene Nebenprodukte:

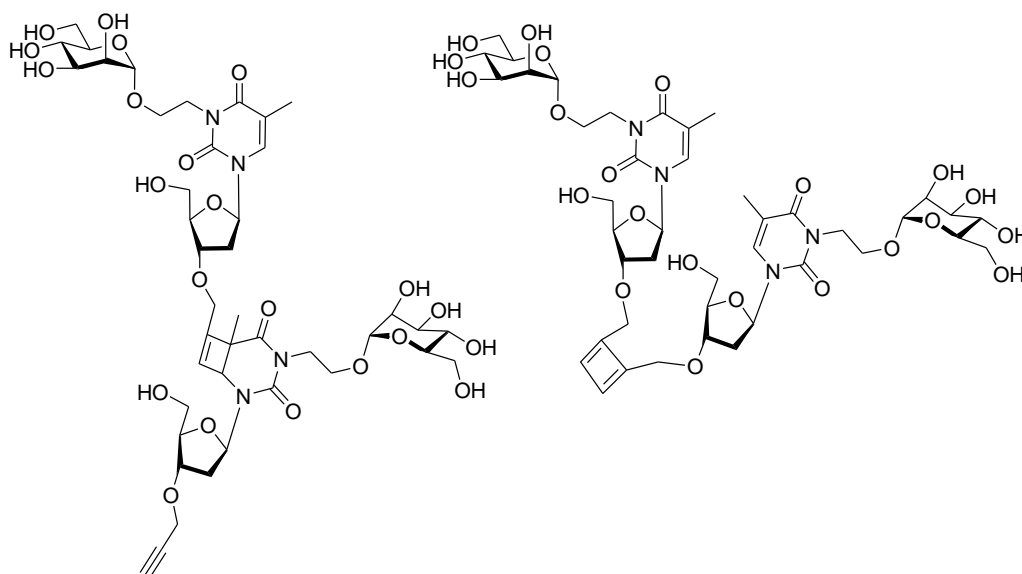


Abbildung 61: Die photoinduzierte Dimerisierung des Alkins **45** führt zu einem untrennbaren Produktgemisch. Vermutlich geht die Alkingruppe unter Bestrahlung ebenfalls eine Cycloaddition ein.

Die Immobilisierung des Propargyl-Glycothymidins **45** auf der Azid-terminierten Oberfläche **40** erfolgte unter den Bedingungen, die auch für „Click-Reaktionen“ in Lösung erfolgreich waren. Da Cu(I)-Salze in Lösung oxidationsempfindlich sind, wurde ein Cu(II)-Salz verwendet, welches durch Zugabe von Natriumascorbat *in situ* zu Cu(I) reduziert wird.

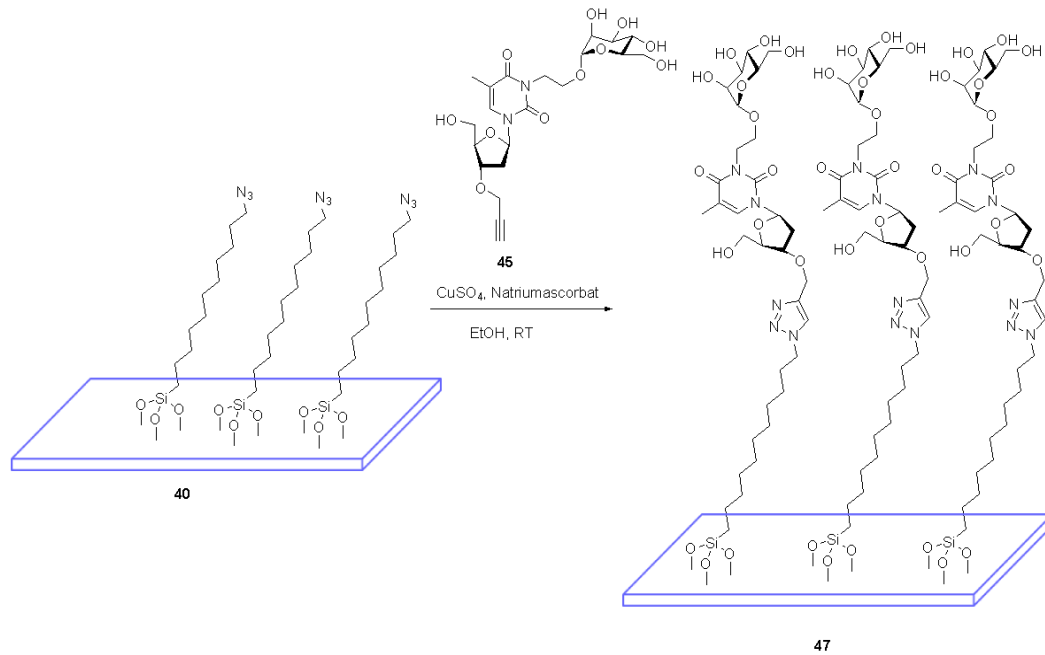


Abbildung 62: Darstellung der Glycothymidin-funktionalisierten Oberfläche durch 1,3-dipolare Cycloaddition des Propargyl-Glycothymidins 39 auf der Azid-terminierten Quarzoberfläche.

Der Erfolg der Oberflächenfunktionalisierung konnte UV-spektroskopisch nachgewiesen werden. Im UV-Spektrum des über „Click-Chemie“ dargestellten Glycothymidin-SAMs **47** ist das für Thyminverbindungen typische Absorptionsmaximum bei ~ 267 nm zu sehen (Abbildung 63).

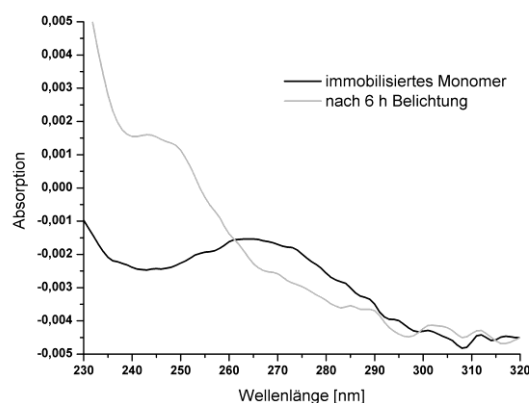


Abbildung 63: UV-Spektrum des über „Click-Chemie“ dargestellten Glycothymidin-SAMs **47** vor (schwarz) und nach (grau) Belichtung mit Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm.

Die über die 1,3-dipolare Cycloaddition immobilisierten Glycothymidine ließen sich ebenso auf der Oberfläche dimerisieren wie die über Thioharnstoffkupplung dargestellten

SAMs. Dazu wurden die Glycothymidin-funktionalisierten Oberflächen **47** einer Bestrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm ausgesetzt (Abbildung 64). UV-spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass infolge der Belichtung auf der Oberfläche ein Rückgang der Thymin-spezifischen Absorptionsbande bei 267 nm zu beobachten ist (Abbildung 63). Gleichzeitig ist sehr deutlich die Entstehung einer Absorptionsbande bei 240 nm zu sehen, welche charakteristisch für das Cyclobutan ist. Somit konnte auch in diesem Fall die Dimerisierung auf der Oberfläche nachgewiesen werden.

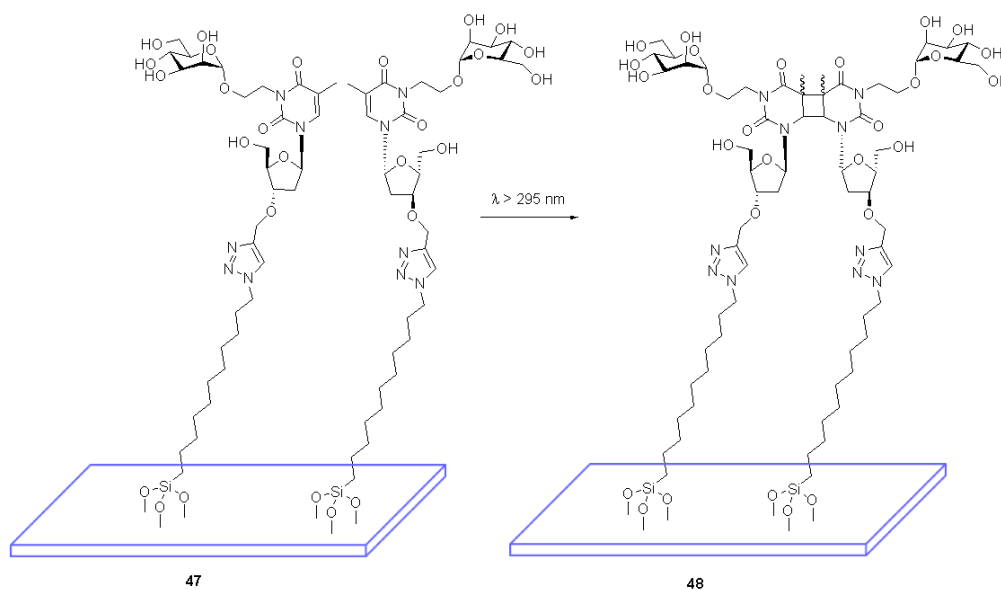


Abbildung 64: Photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition der immobilisierten Glycothymidine auf der Quarzoberfläche.

ZUSAMMENFASSUNG: SYNTHESE VON ALKIN **45** UND IMMOBILISIERUNG AUF QUARZGLAS

Unter Verwendung einer geeigneten Schutzgruppenstrategie konnte das 3'-Propargyl-Glycothymidin **45** dargestellt und mit Hilfe der kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition an zuvor Azid-terminierte Quarzoberflächen **40** gebunden werden. Die so erhaltenen Glycothymidin-SAMs **47** wurden mit einer Quecksilber-Mitteldrucklampe bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm bestrahlt. Sowohl die Immobilisierung als auch die photoinduzierte Dimerisierung auf der Oberfläche konnten UV-spektroskopisch nachgewiesen werden. Diese Oberflächen stehen nun für bakterielle Adhäsionsstudien zur Verfügung.

3.3.3 Funktionalisierung der Oberfläche durch Peptidkupplung

Eine weitere Möglichkeit Glycothymidin-Derivate auf Quarzglas zu immobilisieren stellt die Peptidkupplung dar, wie sie auch zur Funktionalisierung der Polystyrolmikrotiterplatten verwendet wurde (vgl. Abschnitt 3.1.2). Dazu muss die Quarzoberfläche zunächst mit einem Aktivester vorfunktionalisiert werden, welcher anschließend mit dem Aminoglycothymidin **22** (zur Synthese von **22** Abschnitt 3.1.2) umgesetzt werden kann. Da das Aminoglycothymidin **22** problemlos in Lösung dimerisiert und das Dimer **24** isoliert werden kann, ist es möglich, dieses ebenfalls zu immobilisieren. So kann zusätzlich das in Lösung dimerisierte und anschließend immobilisierte Glycothymidin mit dem auf der Oberfläche dimerisierten Glycothymidin verglichen werden. Für die Darstellung der Aktivester-terminierten Quarzoberfläche wurde hier Pentafluorundecanoatrimethoxysilan (**49**) verwendet. Dieses wurde in Dichlormethan gelöst und das Quarzsubstrat über Nacht bei 37 °C in der Lösung inkubiert. Die anschließende Peptidkupplung mit Aminoglycothymidin **22** auf der Aktivester-funktionalisierten Oberfläche **50** fand in Dimethylformamid bei Raumtemperatur statt und lieferte die Glycothymidin-funktionalisierte Oberfläche **51** (Abbildung 65).

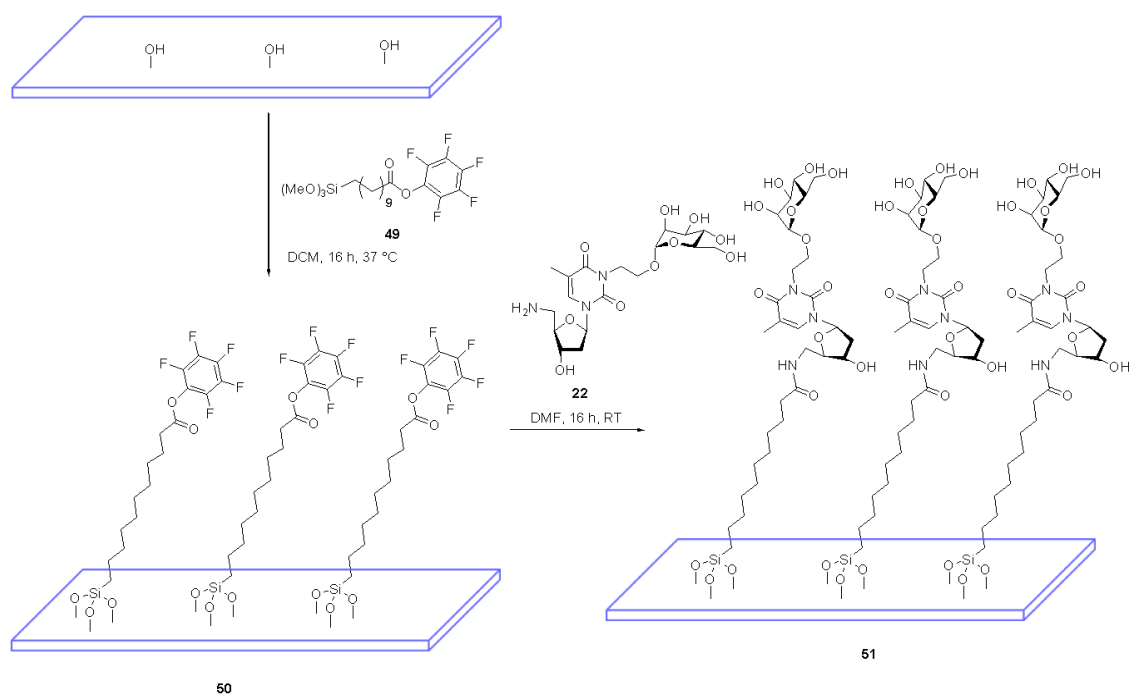


Abbildung 65: Funktionalisierung der Quarzsubstrate mit Pentafluorundecanoatrimethoxysilan (**49**) und anschließende Peptidkupplung mit dem Amin **22** auf der Oberfläche **50** liefern die Glycothymidin-funktionalisierte Quarzoberfläche **51**.

Der Nachweis der Immobilisierung erfolgte auch hier UV-spektroskopisch. In Abbildung 66 ist das UV-Spektrum des immobilisierten Glycothymidins **51** zu sehen. Das Absorptionsmaximum bei 267 nm ist charakteristisch für Thyminverbindungen. Werden die funktionalisierten Quarzsubstrate **51** mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm bestrahlt, so geht die für Thymin charakteristische Absorptionsbande deutlich zurück.

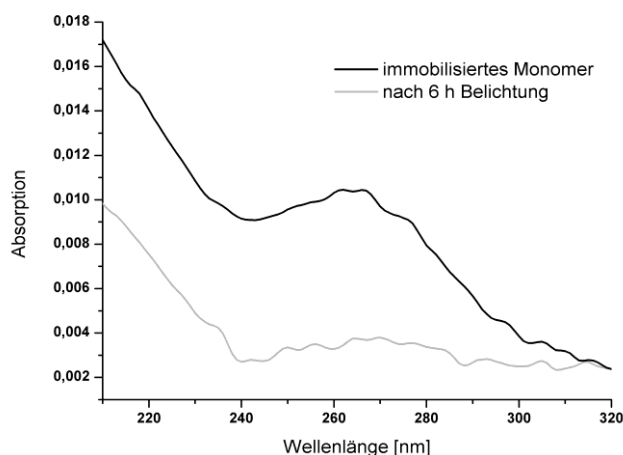


Abbildung 66: UV-Spektrum des über Peptidkupplung auf Quarzglas immobilisierten Aminoglycothymidins **22**.

ZUSAMMENFASSUNG: IMMOBILISIERUNG VON AMINOTHYIMIDIN **22 AUF QUARZGLAS**

Aminoglycothymidin-Derivate konnten wie schon auf Polystyrol- nun auch auf Quarzoberflächen immobilisiert werden. Der Nachweis der Immobilisierung sowie der Dimerisierung auf der Quarzoberfläche konnte UV-spektroskopisch erbracht werden. Amine haben im Vergleich zu den Isothiocyanaten und Alkinen den Vorteil, dass die Dimere in Lösung dargestellt und isoliert werden können und folglich durch direkte Immobilisierung der Dimere auch ein Vergleich mit den auf der Oberfläche entstandenen Dimeren möglich ist. Die erhaltenen Oberflächen stehen nun für bakterielle Adhäsionstests zur Verfügung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verwendung von Quarzoberflächen für die Immobilisierung der Glycothymidine das Projekt entscheidend vorangebracht hat: Erstmals konnte die Dimerisierung der Thymineinheiten auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Dieser Nachweis ist essentiell für die Interpretation der aus den Adhäsionsstudien erhaltenen Ergebnisse.

3.4 Amphiphile Glycothymidin-Derivate

Untersuchungen zur Glycocalyxfunktion erfordern nicht nur den Einsatz von Glycomimetika zur Nachbildung von Glycocalyx-Glycokonjugaten, sondern auch ein geeignetes supramolekulares Mimetikum für die Zelloberfläche. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Mimetika weisen alle dieselbe Struktur auf: Glycokonjugate sind kovalent an eine starre Oberfläche wie Polystyrol, Gold oder Glas gebunden (Abschnitt 3.1 - 3.3). Die Plasmamembran von Zellen ist jedoch eine weit flexiblere Struktur. Die Glycokonjugate sind nicht kovalent, sondern durch hydrophobe Wechselwirkungen in der Lipiddoppelschicht verankert und können sogar durch die Lipidmatrix diffundieren. In dem Versuch diesen Zustand einer Zellmembran zu mimikrieren wurden Detergenzien aufgrund ihrer selbst-assemblierenden Eigenschaften eingesetzt. So wurden beispielsweise bei der Strukturanalyse von Membranproteinen durch Kristallisation und NMR-Spektroskopie Detergenzien zur Stabilisierung von Proteinen verwendet.^[175-177] In der Glycobiologie wurden Mizellen aus Glyco- und Phospholipiden gebildet und als Mimetikum für die Zellmembran genutzt, um z. B. Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zu untersuchen. So wurden die Wechselwirkungen zwischen Glycolipid-Mizellen und einem Glycolipid-Monolayer an der Grenzfläche zwischen Wasser und Luft untersucht.^[178] MARES et al. gelang es, Glycolipide in Phospholipid-Mizellen einzulagern, und mit Hilfe dieser Technik die Kohlenhydrateinheiten der Zelloberfläche mittels NMR-Spektroskopie zu untersuchen.^[179]

Von K. SCHWEKENDIEK wurden amphiphile Glycothymidin-Derivate synthetisiert und in Natriumdodecylsulfat(SDS)-Mizellen eingelagert. Diese Mizellen sollen dabei ein einfaches Mimetikum für die glycosylierte Zellmembran darstellen. Dadurch konnte die Thymindimerisierung innerhalb eines supramolekularen Zusammenhangs, dem Mizellverbund, untersucht werden (Abbildung 67).^[112] NMR-spektroskopische Untersuchungen an diesem Modell konnten zeigen, dass die Glycothymidin-Derivate in die SDS-Mizellen eingelagert wurden und die Dimerisierung im Mizellverbund ebenso wie in Lösung stattfinden kann.^[112]

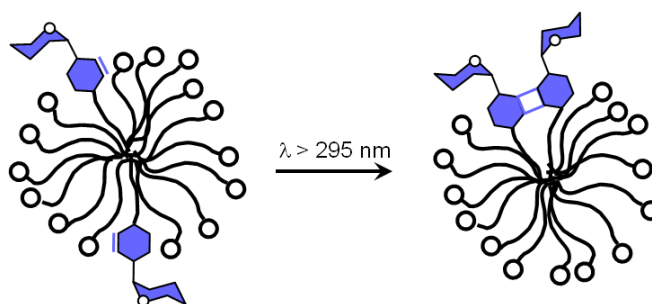


Abbildung 67: Schematische Darstellung der in SDS-Mizellen eingelagerten Glycothymidin-Derivate und Photodimerisierung der Thymineinheiten im Mizellverbund.^[112]

Eine Untersuchung der bakteriellen Adhäsion innerhalb dieses Mizellverbunds ist jedoch nicht trivial. SDS führt als starkes ionisches Detergenz zur Auflösung der bakteriellen Zellmembran. In dieser Arbeit wurde daher ein alternatives System zur Mimikrierung der Zelloberfläche angestrebt, das weiterhin die laterale Diffusion der Glykokonjugate ermöglicht, ohne jedoch den Einsatz von Detergenzien zu erfordern. Dazu wurde zunächst das amphiphile Glycothymidin-Derivat mit Hilfe von Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) auf eigenständige Aggregation hin untersucht. Sollten die Glycothymidin-Derivate ohne Hilfe von Detergenzien Mizellen ausbilden können, so würden diese ein hervorragendes Zellmimetikum für die angestrebten biologischen Untersuchungen darstellen.

3.4.1 Synthese amphiphiler Glycothymidine

Die Synthese des amphiphilen Glycothymidin-Derivats **52** gelang alternativ zu dem von K.SCHWEKENDIEK vorgeschlagenen Syntheseweg^[112] in einer Stufe aus dem ungeschützten Isothiocyanat **29** durch Thioharnstoff-Kupplung mit Octylamin. Die Reaktion lieferte **52** in 73 % iger Ausbeute (Abbildung 68).

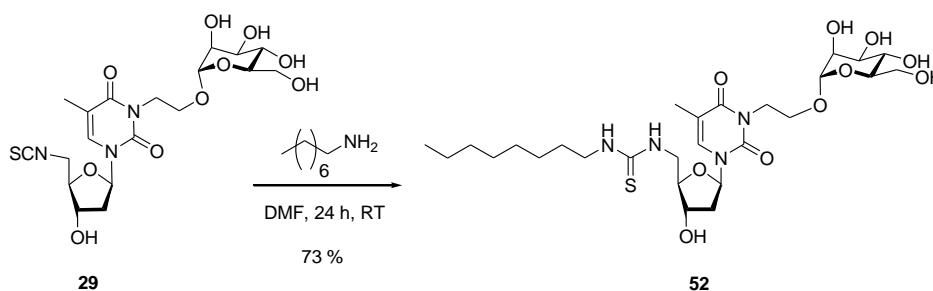


Abbildung 68: Synthese des amphiphilen Glycothymidins **52** aus dem Isothiocyanat **29** durch Thioharnstoffkupplung mit Octylamin.

Die Dimerisierung des amphiphilen Glycothymidins **52** erfolgte in Wasser mit Aceton als Triplettensensitizer. Die Bestrahlung wurde mit einer Quecksilberdampfampe bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm durchgeführt und lieferte nach 6 h das Dimer **53** in Ausbeuten um 75 % (Abbildung 69).^[112]

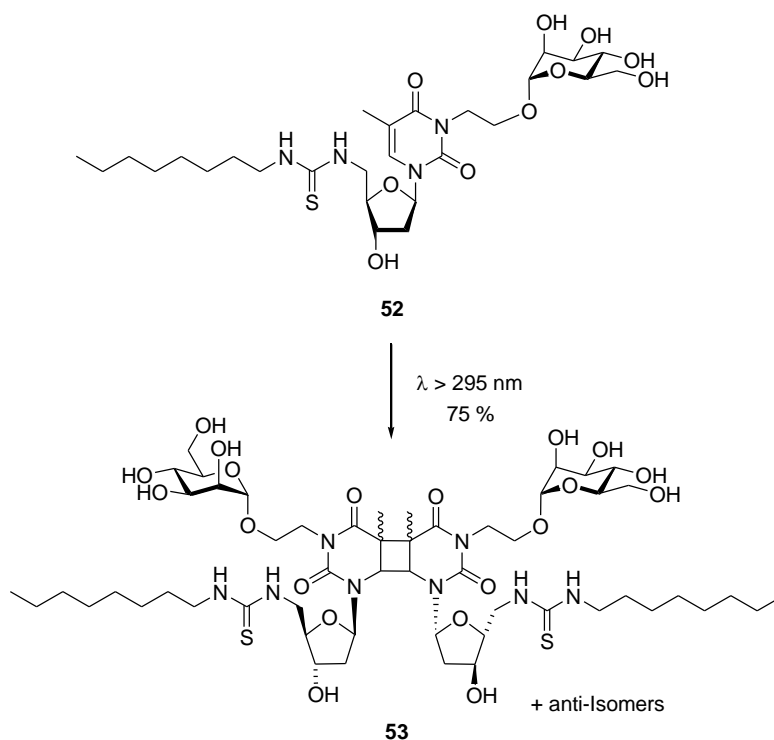


Abbildung 69: Photoinduzierte Dimerisierung des amphiphilen Glycothymidins **52** lieferte das Dimer **53** als Stereoisomerengemisch in 75 % Ausbeute.

ITC-Messungen wurden zur Untersuchung der Überstrukturbildung herangezogen. Dazu wurde eine 250 mM Lösung des amphiphilen Glycothymidins **52** in zweifach deionisiertem Wasser hergestellt und unter quasi-isothermen Verhältnissen bei einer definierten Temperatur von 25 °C mittels ITC untersucht. Jede Messung umfasst 100 Einzelinjektionen, wovon jede eine definierte Menge (3 μ L) der Amphiphillösung enthält. Die injizierte Lösung löst eine supramolekulare Reaktion in der Probenzelle aus, welche in Form eines Peaks mit veränderter Enthalpie in einem Kalorigramm festgehalten wird. Nachdem die Probenzelle wieder ins thermische Gleichgewicht gebracht wurde, kann die nächste Injektion erfolgen. Die durchgeführten Messungen zeigten kein Aggregationsverhalten für **52** in wässriger Lösung. Die amphiphilen Glycothymidine können daher wohl kaum ohne Zuhilfenahme anderer Materialien in Mizellen überführt werden.

3.4.2 Darstellung von Glycoarrays durch nicht-kovalente, hydrophobe Bindung

Einen weiteren Ansatz für die Darstellung eines in gewisser Weise flexiblen Mimetikums der glycosylierten Zelloberfläche stellte die Oberflächenbeschichtung mittels hydrophober Wechselwirkungen dar. Diese Methode wurde bereits 2003 für die Darstellung von Kohlenhydrat-Arrays auf Mikrotiterplatten verwendet. WONG et al. ist es gelungen, Glycolipide nicht-kovalent an Mikrotiterplatten zu binden und diese so in biologischen Assays zu untersuchen.^[180,181] Im Rahmen dieser Arbeit wurde das amphiphile Glycothymidin-Derivat **52** über hydrophobe Wechselwirkungen auf Polyethylen-Mikrotiterplatten immobilisiert, um so Glycothymidin-Arrays zu erhalten, die in bakteriellen Adhäsionsstudien Anwendung finden können.

Das amphiphile Glycothymidin-Derivat **52** wurde für eine hydrophobe Beschichtung auf UV-durchlässigen Polyethylenplatten der Firma Greiner Bio-One verwendet (Abbildung 70). Dazu wurde eine ethanolische Lösung von **52** in die Wells einer Polyethylen-Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

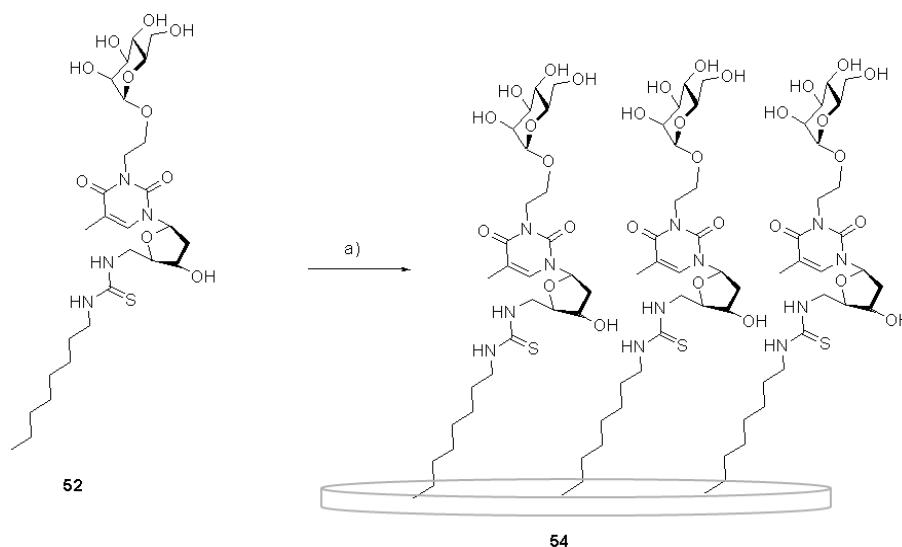


Abbildung 70: Immobilisierung des amphiphilen Glycothymidins **52** durch hydrophobe Wechselwirkungen auf Polyethylen-Mikrotiterplatten. a) Die Polyethylenplatte wurde mit einer ethanolischen Lösung von **52** über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach einigen Waschschriffen konnte der Erfolg der nicht-kovalenten Beschichtung auf der Oberfläche **54** anhand von UV-Messungen im Wellenlängenbereich von 260 nm untersucht werden (Abbildung 71). Die speziellen Polyethylenmikrotiterplatten der Firma

Greiner Bio-One sind im Bereich von 260 nm UV-transparent und eignen sich deshalb gut für die Untersuchung der [2+2]-Cycloaddition auf der Oberfläche.

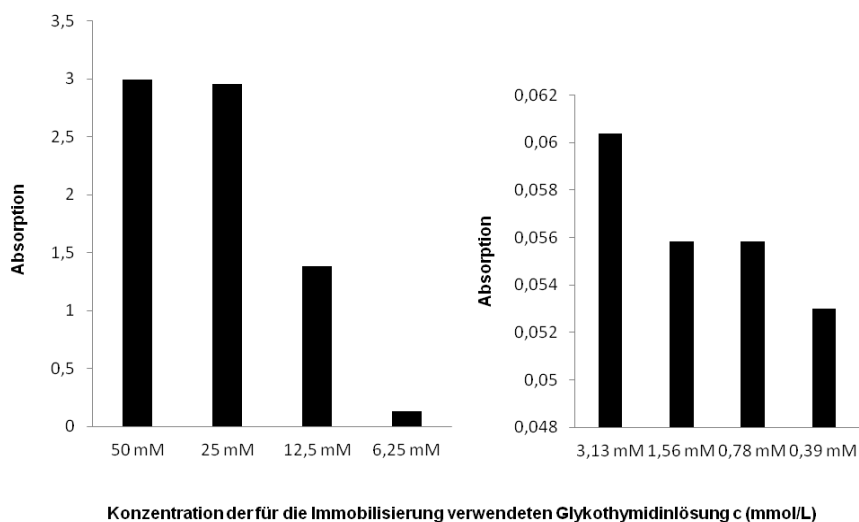


Abbildung 71: Gezeigt ist die UV-Absorption des über hydrophobe Wechselwirkungen auf Polyethylenoberflächen gebundenen Glycothymidins **52** bei einer Wellenlänge von 260 nm. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Absorptionen bei hohen Konzentrationen (links) und niedrigen Konzentrationen (rechts) getrennt dargestellt.

Das Absorptionsmaximum bei 260 nm ist charakteristisch für Thyminverbindungen. Eine Absorption in diesem Wellenlängenbereich beweist damit die Anhaftung der Glycothymidine auf der Oberfläche **54**. Die Absorption nimmt wie erwartet mit abnehmender Konzentration der zur Immobilisierung verwendeten Lösung ab. Es konnte gezeigt werden, dass Glycothymidin-Derivate über hydrophobe Wechselwirkungen nicht-kovalent an hydrophobe Oberflächen gebunden werden können.

Um eine [2+2]-Cycloaddition der Thymineinheiten auf der Oberfläche **54** herbeizuführen wurden die Wells mit je 100 μ L Wasser gefüllt und eine Hälfte der Platte wurde zum Schutz vor Strahlung mit Aluminiumfolie abgedeckt, während die andere Hälfte mit einer Quecksilber-Mitteldrucklampe bei einer Wellenlänge von > 295 nm bestrahlt wurde. Nach der Bestrahlung wurde das Wasser entfernt und die Platte erneut UV-spektroskopisch vermessen. Auf der belichteten Hälfte der Platte wurde ein Rückgang der UV-Absorption bei 260 nm erwartet, da infolge der Bestrahlung die Thymineinheiten eine [2+2]-Cycloaddition eingehen und somit das konjugierte System der Thyminbasen aufgebrochen wird.

Jedoch zeigte sich auch für die vor Lichteinwirkung geschützte Hälfte der Platte ein Rückgang der UV-Absorption (Abbildung 72). Es macht den Eindruck als sei die komplette Beschichtung weggewaschen worden. Weitere Immobilisierungsexperimente bestätigten, dass die hydrophobe Beschichtung infolge von Wärmeeinwirkung im Wasser gelöst wird. Damit ist die Stabilität der hydrophoben Beschichtung für die Bestrahlung nicht ausreichend.

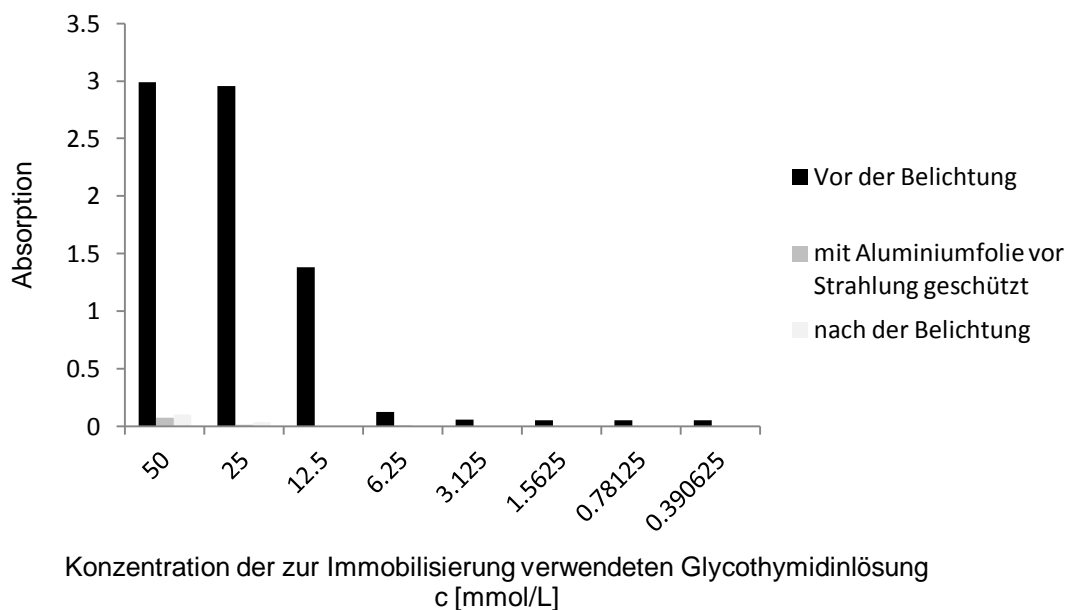


Abbildung 72: Gezeigt ist die UV-Absorption des über hydrophobe Wechselwirkungen auf Polyethylenoberflächen gebundenen Glycothymidins **52** nach der Bestrahlung. Die Werte wurden für eine Wellenlänge von 260 nm ermittelt. In schwarz sieht man noch einmal die Absorption der immobilisierten Verbindung **52** vor der Belichtung (siehe Abbildung 71). Nach der Belichtung ist sowohl für die Belichtete Hälfte der Platte (hellgrau) als auch für die mit Aluminiumfolie geschützte Hälfte der Platte kaum Absorption detektierbar.

Die Stabilität der hydrophoben Beschichtung variiert mit der Länge der Alkylketten der immobilisierten Substanzen.^[180] Daher wurde ein Glycothymidin mit längerer Alkylkette als in **52** synthetisiert. Dazu wurde das Isothiocyanat **29** in einer Thioharnstoffkupplung mit Dodecylamin umgesetzt (Abbildung 73). Das Thymidin-Derivat **55** wurde in 76 % Ausbeute erhalten.

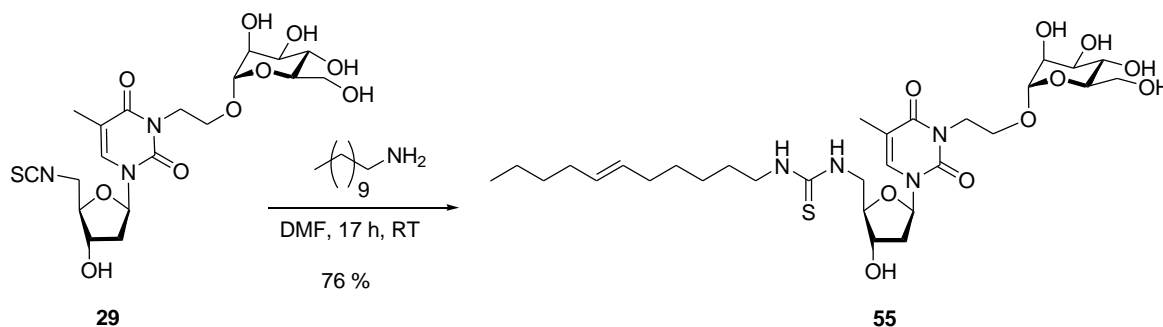


Abbildung 73: Darstellung des amphiphilen Glycothymidins **55** durch Thioharnstoffkupplung von Isothiocyanat **29** mit Dodecylamin.

Aus Zeitgründen konnten im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen mit dem amphiphilen Glycothymidin-Derivat **55** durchgeführt werden.

ZUSAMMENFASSUNG: SYNTHESE UND ANWENDUNG AMPHIPHILER GLYCOTHYIMIDINE

Es konnten zwei amphiphile Glycothymidin-Derivate mit unterschiedlicher Kettenlänge im hydrophilen Teil dargestellt werden. Die Dimerisierung des Amphiphils **52** in Lösung konnte problemlos durchgeführt und das Dimer in 75 % Ausbeute isoliert werden. Das Amphiphil **52** konnte ferner für eine hydrophobe Beschichtung auf Polyethylenoberflächen verwendet werden. Um dieses System für Studien der bakteriellen Adhäsion an glycosylierte Oberflächen nutzen zu können, bedarf es allerdings noch Optimierungen hinsichtlich der Stabilität dieser Oberflächen unter physiologische Bedingungen. Diese Optimierungen könnten durch Verlängerung der Kettenlänge der Amphiphile erreicht werden.

ITC-Messungen zeigten, dass bei dem amphiphilen Glycothymidin **52** keine Bildung von Mizellen erfolgt. Es wäre jedoch denkbar die Glycothymidin-Derivate in neutrale Mizellen, wie beispielsweise Phospholipid-Mizellen, einzulagern, um die bakterielle Adhäsion im Mizellverbund zu untersuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das hier erarbeitete System viel Potenzial für weitere Arbeiten bereit hält.

3.5 Synthese divalenter Glycothymidin-Derivate

Die auf der Zelloberfläche exponierten Oligosaccharide und Glykokonjugate liegen in hoch verzweigter Form vor. Ein Weg sich synthetisch dieser hyperverzweigten Form anzunähern ist die Verwendung verzweigter, multivalenter Glycomimetika. Dendrimere bieten eine hervorragende Möglichkeit diese verzweigten Glykokonjugate darzustellen. Bei Dendrimeren handelt es sich um einheitlich hyperverzweigte Strukturen, die aus einem multivalenten Kernmolekül durch generationsweisen Aufbau dargestellt werden können. Von diesem Kernmolekül ausgehend verzweigt sich die Struktur, dabei bilden die funktionellen Gruppen der jüngsten Generation wieder den Ausgangspunkt für die nächste Generation. Der Begriff Dendrimer ist von den griechischen Worten *dendron* (der Baum) und *meros* (der Teil) abgeleitet und beschreibt eine Struktur, die sich ausgehend von einem multifunktionellen Kernmolekül durch generationsweises Wachstum gleich einem Baum verästelt. Die Äste werden Dendronen genannt, sie bestehen aus repetitiven Einheiten und bilden so ein Molekül radialer Symmetrie, dessen dreidimensionale Struktur hyperverzweigt ist. Dendrimere werden durch iterative Synthesemethoden hergestellt und erreichen Molekülmassen ähnlich denen der Polymere. Sie haben jedoch den Vorteil, dass sie einheitliche Strukturen aufweisen und im Idealfall monodispers sind. Über die funktionellen Gruppen der jüngsten Generation können Kohlenhydrate an die Peripherie der Dendrimere gebunden werden. Die so erhaltenen Kohlenhydrat-funktionalisierten Dendrimere werden Glycodendrimere genannt^[182] und wurden 1993 zum ersten Mal von ROY ET AL. synthetisiert.^[183] Glycodendrimere können effektiv Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen inhibieren und sind daher besonders in der Glycobiologie von großer Bedeutung.^[184] Bei dem Begriff „Glycodendrimer“ muss zwischen den hier erwähnten Dendrimeren mit Kohlenhydrat-Endgruppen^[185–187] und den Kohlenhydrat-zentrierten Dendrimeren unterschieden werden.^[188–191]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene divalente Glycothymidin-Derivate dargestellt, welche der Untersuchung konformationeller Kontrolle bei der zellulären Adhäsion an Kohlenhydrat-funktionalisierte Oberflächen dienen sollen. Zwei dieser Derivate wurden auf Basis der Dendrimer-Chemie dargestellt und bieten daher die Möglichkeit auch höhervalente Derivate zu synthetisieren.

3.5.1 Divalente Glycothymidin-Thioharnstoffderivate

Die einfachste Methode ein divalentes Glycothymidin-Derivat zu erzeugen stellt die Dimerisierung der Glycothymidine dar. Neben der bereits erwähnten Photodimerisierung durch [2+2]-Cycloaddition der Thyminbasen zu den entsprechenden Cyclobutan-Dimeren (Abschnitt 2.1.1) wurde hier die Dimerisierung der Glycothymidine über eine Thioharnstoffbrücke realisiert. Hierzu wurde das Aminoglycothymidin-Derivat **22** in einer Thioharnstoff-Kupplung mit dem Isothiocyanato-funktionalisiertem Glycothymidin **29** zum Dimer **56** umgesetzt. Das Dimer **56** wurde unter Zusatz der Base DIPEA dargestellt und konnte mit einer Ausbeute von 55 % isoliert werden. Die freien Hydroxygruppen an 3'-Position der Ribose bieten die Möglichkeit weiterer Funktionalisierung oder Immobilisierung des divalenten Glycothymidins **56** auf eine Oberfläche oder einen Scaffold anderer Art.

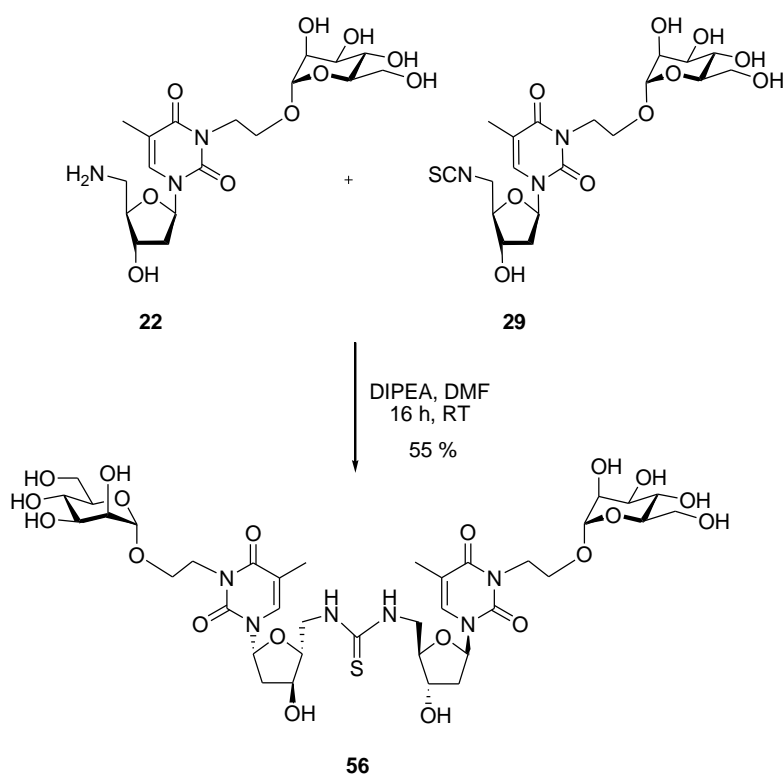


Abbildung 74: Darstellung von Thioharnstoff-verbrücktem Glycothymidin-Dimer **56** ausgehend von **22** und **29**.

Würde man nun das Dimer **56** bestrahlen um die [2+2]-Cycloaddition der Thymineinheiten zu bewirken, könnte man die konformationelle Beweglichkeit des Systems stark einschränken. Deshalb wurde die hier erhaltene divalente Verbindung **56**

zunächst im analytischen Maßstab mit Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm belichtet. Zusätzlich zur intramolekularen [2+2]-Cycloaddition kann sich in diesem Fall auch eine intermolekulare Addition ergeben. Diese würde zur Bildung von Oligomeren oder sogar Polymeren führen und ist nicht erwünscht. Um ausschließlich das aus intramolekularer Cycloaddition resultierende Produkt zu erhalten, wurde die divalente Verbindung in stark verdünnter Lösung belichtet. Es wurde eine 0.4 mM Lösung von **56** in einem 1:1-Gemisch von Wasser und Aceton hergestellt und nach Entgasung im Stickstoffstrom 3 h bei Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm belichtet. Aceton diente hierbei als Triplettensensitizer.

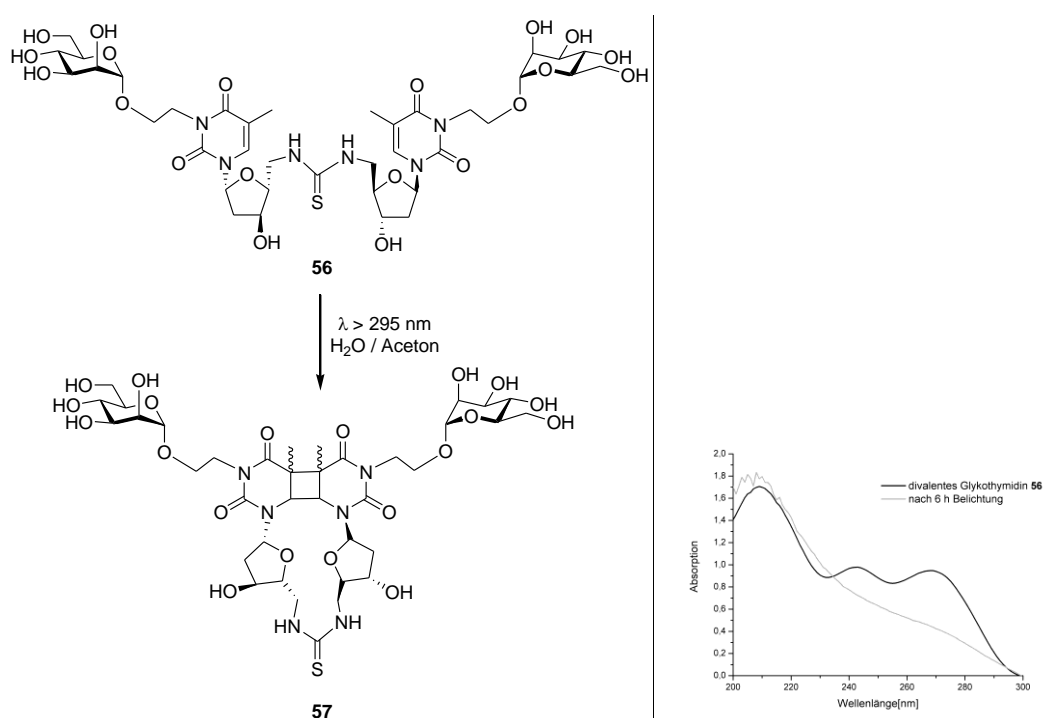


Abbildung 75: Intramolekulare [2+2]-Cycloaddition der Thyminbasen von **56**. Die Cycloaddition wurde UV-spektrometrisch verfolgt. UV-Spektrum des divalents Glycothymidin-Derivats **56** vor (schwarz) und nach (grau) der Belichtung.

Die Entstehung des Photodimerisierungsproduktes wurde UV-spektroskopisch und massenspektrometrisch verfolgt. Während sich die Molekülmasse infolge der Belichtung nicht veränderte, war im UV-Spektrum eine deutliche Abnahme der für Thymin-Verbindungen typischen Absorptionsbande bei 267 nm zu beobachten (Abbildung 75). Diese Ergebnisse bestätigen die [2+2]-Cycloaddition und legen einen intramolekularen Reaktionsverlauf und die Entstehung der divalents Verbindung **57** nahe.

Das hier dargestellte Glycothymidinderivat **56** steht nun für biologische Untersuchungen zur Verfügung. Über weitere Funktionalisierung an der 3'-Hydroxygruppe oder der

Thioharnstoff-Funktionalität kann diese Verbindung auch für die Immobilisierung auf einer Oberfläche modifiziert werden.

ZUSAMMENFASSUNG: SYNTHESE UND BELICHTUNG VON THIOHARNSTOFF-GLYCOTHYMIDIN 45

Ausgehend von den Amino- bzw. Isothiocyanato-funktionalisierten Derivaten **22** und **29** wurde das Thioharnstoff-verbrückte, divalente GlycOTHYmidin **56** synthetisiert, welches sich auch für eine Immobilisierung eignet. Eine Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda > 295$ nm in verdünnter Lösung führte zum intramolekular cyclisierten Produkt **57**. Damit eignet sich **56** als Glycomimetikum dessen konformationelle Flexibilität sich durch Bestrahlung beeinflussen und dann in einem z. B. biologischen Zusammenhang testen lässt.

3.5.2 Di- und tetravalente Glycothymidin-Derivate auf Basis von Poly(amidoamin)-Dendrimern

Eine weitere Möglichkeit divalente Thioharnstoff-verbrückte Glycothymidin-Derivate darzustellen bietet die Dendrimer-Chemie. Die ersten Strukturen dieser Art wurden 1978 von VÖGTLE et al. als Kaskaden-ähnliche Moleküle vorgestellt. Die Poly(propylenamin)-Dendrimere werden ausgehend von primären Aminen durch Umsetzung mit Acrylnitril in einer Michael-analogen Reaktion und anschließender Reduktion der Nitrile zu den entsprechenden Aminen gewonnen. Die Amine stehen wiederum als Kernmolekül für die Bildung der nächsten Generation zur Verfügung.^[192] Bald danach entwickelten TOMALIA und Mitarbeiter die Poly(amidoamin)-(PAMAM)-Dendrimere, die er Starbust-Dendrimere nannte. PAMAM-Dendrimere sind aus einem Polyamin-Kernmolekül aufgebaut, das nach Addition an Methylacrylat mit Ethylendiamin umgesetzt wird.^[193,194] Fluorescein-gelabelte Glycodendrimere auf PAMAM-Basis wurden im Arbeitskreis LINDHORST bereits synthetisiert und haben sich als nützlich für die Untersuchung biologischer Mechanismen und die Indikation der entsprechenden Liganden erwiesen.^[187] K. SCHWEKENDIEK hat in ihrer Dissertation die Synthese des ersten PAMAM-Glycothymidin-Derivats der 1. Generation (G1) beschrieben.^[97] Da die Synthese des PAMAM-Grundgerüsts in Lösung recht aufwändig ist, viele Reinigungsschritte benötigt und bei höheren Generationen nicht mehr vollständig abläuft, wurde im Arbeitskreis LINDHORST eine Methode entwickelt, PAMAM-Dendrimere an fester Phase zu synthetisieren.

Die Synthese an fester Phase verringert den Arbeitsaufwand bei der Aufreinigung der erhaltenen Verbindungen erheblich und stellt damit eine gute Alternative zur Synthese in Lösung dar. In Zusammenarbeit mit A. MÜLLER wurden so die ersten PAMAM-Glycothymidin-Derivate (G1 - G2) an fester Phase synthetisiert.^[195] Dafür wurde zunächst über die von ELOFSSON publizierte Carbamat-Linker-Strategie^[196] ein entsprechender Linker an das Trägermaterial gebunden. Als Trägermaterial diente NH₂-TentaGel der Firma Rapp Polymer. Der fluorierte Linker ermöglicht die Kontrolle der Ergebnisse der Festphasenreaktion mittels ¹⁹F-Gelphasen-NMR.^[195,197,198]

Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe reagiert das freie Amin des Linkers **59** in einer Michael-analogen Reaktion mit Methylacrylat zum Diester **60**. Anschließende Kupplung

mit Ethylendiamin ergab das fertige PAMAM-Dendron **61** der 1. Generation (Abbildung 76).

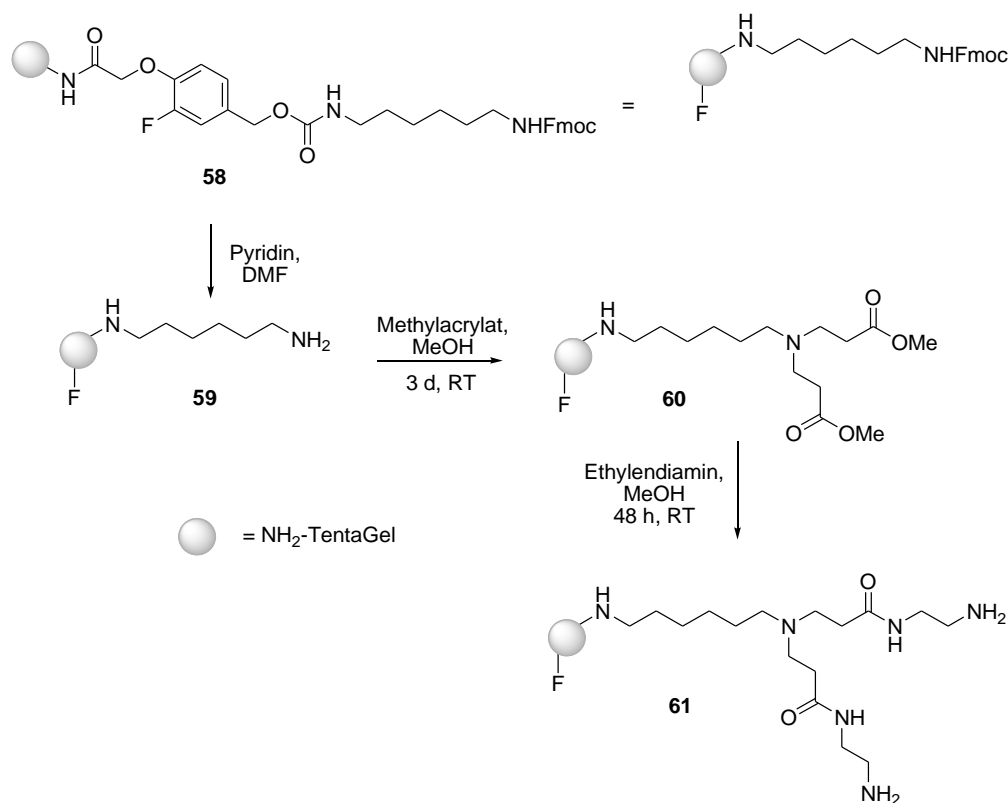


Abbildung 76: Synthese des PAMAM-Dendrons der 1. Generation an fester Phase.

Das verzweigte Diamin **61** konnte nun in einer Thioharnstoffkupplung mit dem Isothiocyanatohyminidin **29** in DMF unter Zugabe der Base DIPEA zum Glycothymidin-Dendron (G1) **62** umgesetzt werden. Die Carbamat-Verknüpfung erlaubt eine saure Abspaltung des Dendrons **63** von der festen Phase (Abbildung 77). Das Glycothymidin-Dendrimer **63** auf PAMAM-Basis wurde mit einer Ausbeute von 10 % über fünf Stufen an fester Phase erhalten. Im Vergleich dazu erfolgte die Synthese derselben Verbindung in Lösung mit einer Ausbeute von 14 %, wobei in Betracht gezogen werden muss, dass eine Synthese in Lösung mit viel mehr Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist. Die Festphasensynthese stellt daher eine gute Alternative zur Nasschemie dar und erleichtert vor allem bei der Synthese von Dendronen höherer Ordnung die Arbeitsschritte erheblich. Entscheidend für den Erfolg der Synthese an fester Phase ist der Einsatz sauberer, destillierter Edukte.

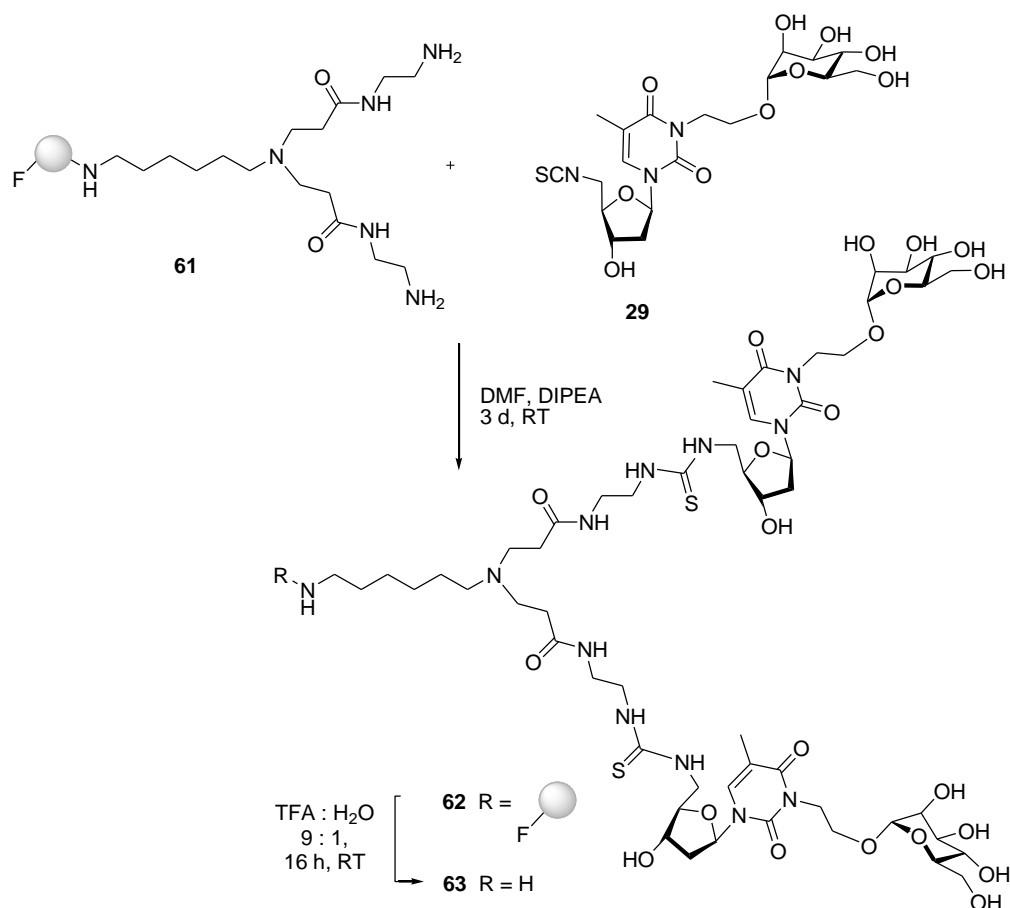


Abbildung 77: Festphasensynthese von Glycothymidin-Dendron (G1) **62 durch Thioharnstoffkupplung mit Isothiocyanat **29** und anschließende Abspaltung vom Trägermaterial unter sauren Bedingungen.**

Die Belichtung des Glycothymidin-Dendrons (G1) **63** wurde in analytischen Mengen durchgeführt. Dazu wurde eine 0.01 %ige Lösung von **63** in Wasser hergestellt und mit Aceton als Triplettensensitizer einer dreistündigen Bestrahlung mit Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm ausgesetzt. Die Entstehung des Cyclobutan-Dimers **64** konnte UV-spektroskopisch und massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Der Rückgang der für Thyminverbindungen typischen Absorptionsbande bei 267 nm bestätigt die erfolgte Photodimerisierung (Abbildung 78).

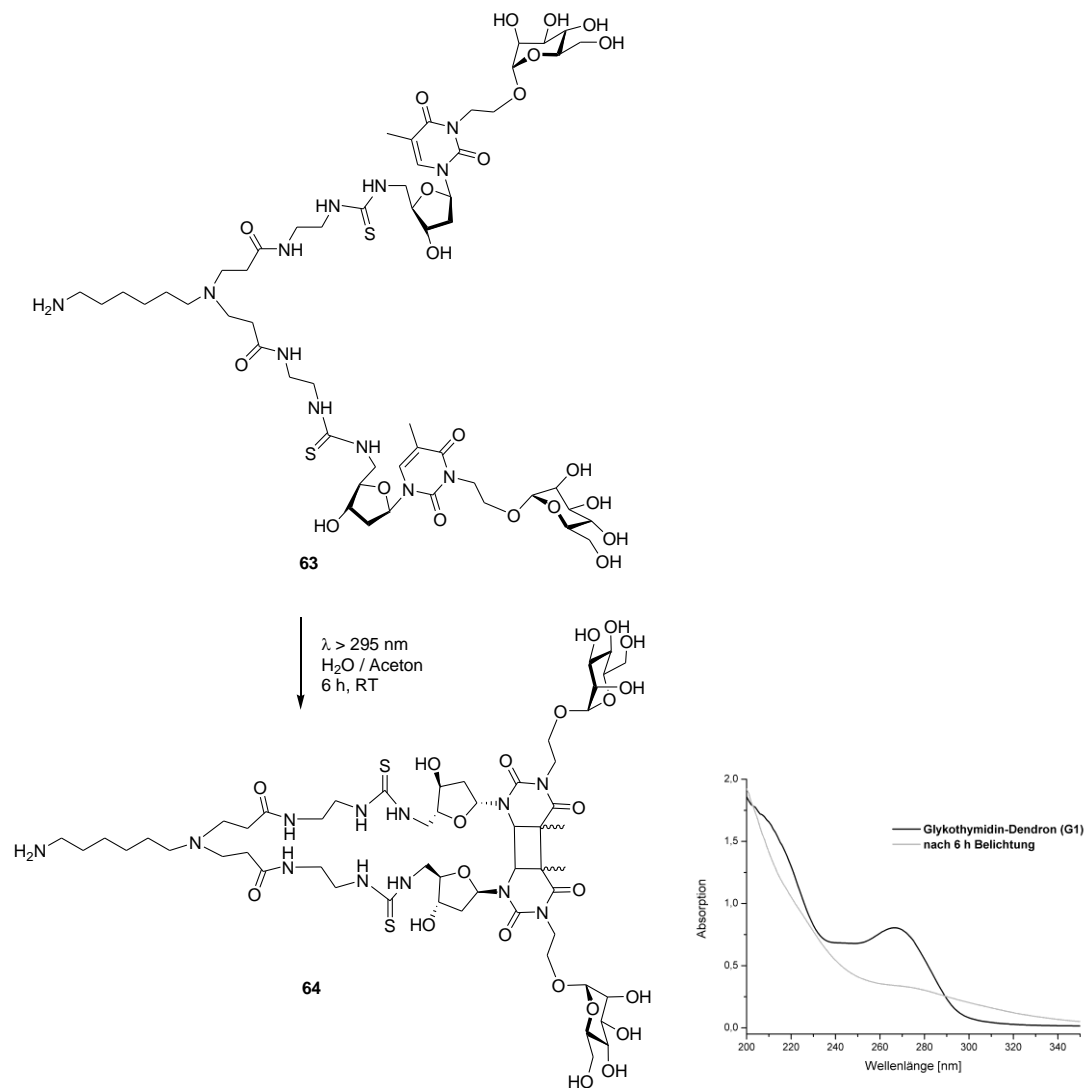


Abbildung 78: Belichtung des Glykothymidin-Dendrons (G1) **63. Durch die photoinduzierte [2+2]-Cycloaddition der Thymineinheiten kommt es infolge der Bestrahlung zu einer Verringerung der Absorbionsintensität bei 267 nm.**

Das Träger-gebundene divalente PAMAM-Dendron (G1) **61** konnte durch erneute Umsetzung mit Methylacrylat und anschließende Kupplung mit Ethylendiamin zum tetravalenten PAMAM-Dendron (G2) **66** umgesetzt werden (Abbildung 79). Eine Kupplung von **66** mit Isothiocyanat **29** in DMF führte jedoch trotz verlängerter Reaktionszeit und Wiederholung des Kupplungsschrittes nicht ausschließlich zum tetravalenten Glykothymidin-Dendron (G2) **67** (Abbildung 79).

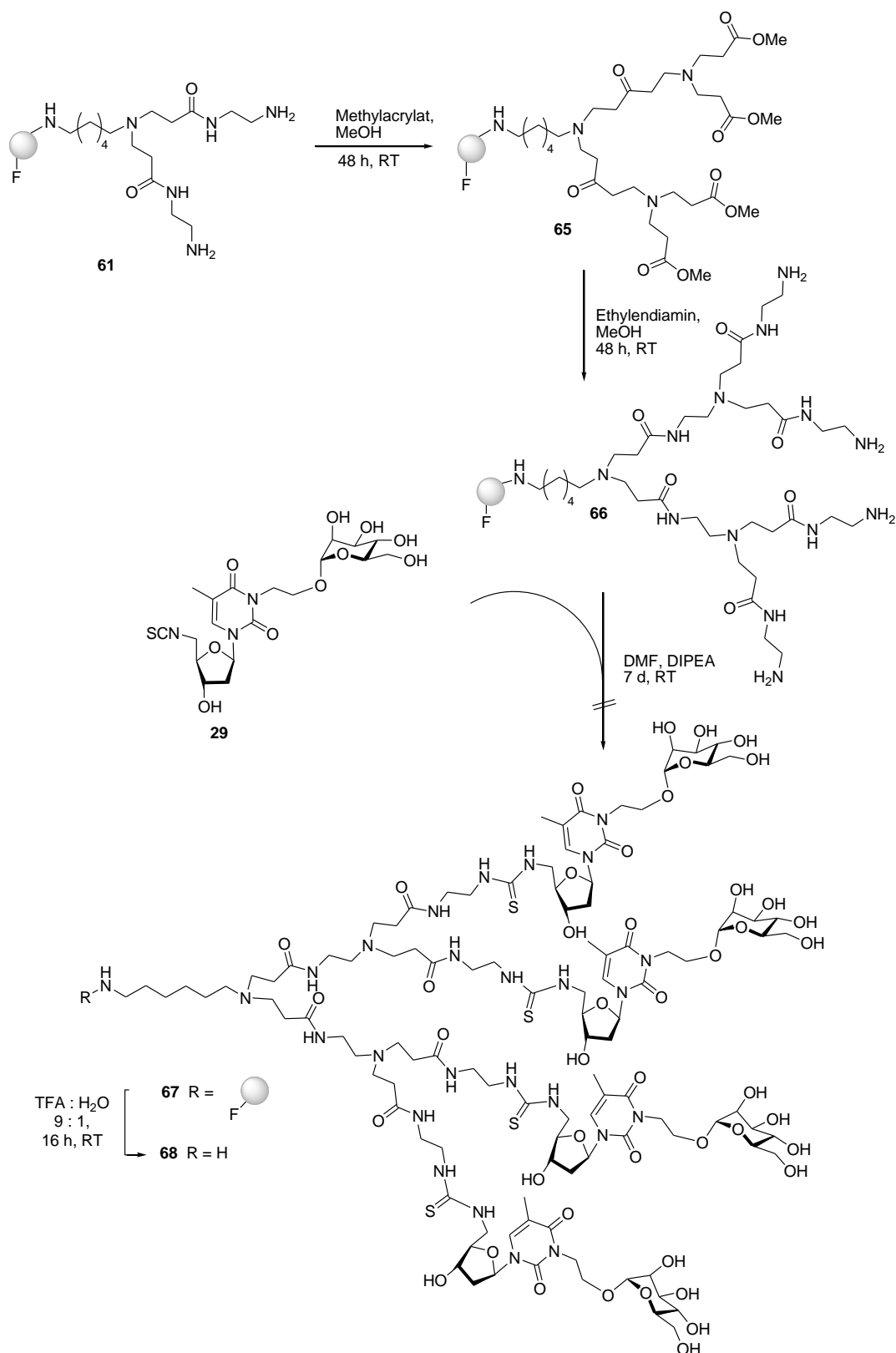


Abbildung 79: Ausgehend von 61 wurde durch erneute Umsetzung mit Methylacrylat und Kupplung mit Ethyldiamin das tetravalente Derivat 66 dargestellt. Thioharnstoffkupplung von 66 mit 29 und Abspaltung vom Trägergel unter sauren Bedingungen. Das tetravalente Glycothymidin-Derivat 68 konnte nicht rein isoliert werden; die Umsetzung war unvollständig.

Laut massenspektrometrischer Analytik wurde neben dem gewünschten Produkt ein Gemisch von Derivaten deren Amingruppen nicht vollständig umgesetzt waren erhalten. Eine Wiederholung der Synthese konnte im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden. Es ist denkbar, dass die Belegungsdichte des Trägermaterials so hoch ist, dass es bei der Synthese des tetravalenten Derivats zu sterischen Hinderungen kommt. Ein weniger hoch belegtes Ausgangsmaterial könnte hier Abhilfe schaffen und zum Erfolg der Synthese führen.

ZUSAMMENFASSUNG: SYNTHESE DI- UND TETRAVALENTER GLYCOTHYIMIDIN-DERIVATE AUF BASIS VON PAMAM-DENDRIMERN AN FESTER PHASE

In einer Arbeitskreis-internen Kooperation mit A. MÜLLER wurde eine Methode entwickelt, Glycothymidin-Dendronen an fester Phase zu synthetisieren. Mit Hilfe der Festphasensynthese konnten mit wenig Aufwand das divalente Glycothymidin-Dendron **63** dargestellt werden. Vor allem für die Synthese von Dendronen höherer Generation wird der Arbeitsaufwand durch die Synthese an fester Phase gegenüber der Synthese in Lösung erheblich verringert. Die Synthese des tetravalenten Glycothymidins **68** bedarf weiterer Optimierung, die im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht erfolgen konnte. Es ist anzunehmen, dass die Synthese von **67** aufgrund sterischer Hinderung nicht vollständig ablief. In diesem Fall wäre eine geringere Belegungsdichte des Ausgangsmaterials ratsam.

Das neue Glycothymidin-Dendron **63** wurde erstmals durch Bestrahlung mit Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm einer intramolekularen [2+2]-Cycloaddition unterzogen. Der Erfolg der Cycloaddition konnte UV-spektroskopisch nachgewiesen werden.

3.5.3 Aliphatische Polyetherdendrimere: Synthese divalenter Glycothymidin-Derivate

Die 1998 von FRÉCHET^[199] über konvergente Synthese dargestellten aliphatischen Polyether-Dendronen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sterisch wenig anspruchsvoll sind und es ermöglichen hochverzweigte Derivate höherer Generationen praktisch zu erhalten. Die chemische Stabilität dieser Dendronen gegenüber oxidativen, reduktiven, basischen und schwach sauren Bedingungen erlaubt den Einsatz in verschiedenen Bereichen der Chemie. Einen weiteren Vorteil der aliphatischen Polyether-Dendronen stellt die Möglichkeit der vielfältigen Modifikation sowohl am fokalen Punkt als auch an der Peripherie dar. Aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität eignen sich diese Bausteine besonders gut für die Anwendung bei Untersuchungen von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen. Sie werden deshalb im Folgenden für den Aufbau eines heterogenen divalenten Glycothymidin-Derivats verwendet.

Das für die Synthese dieser Bausteine verwendete Methallyldichlorid (MDC) ist durch die Allylstellung der Chloratome für eine doppelte nukleophile Substitution aktiviert und ergibt aufgrund seiner Molekülsymmetrie unabhängig vom Substitutionsmechanismus (S_N1 , S_N2 oder S_N2') das gleiche Produkt (Abbildung 80).

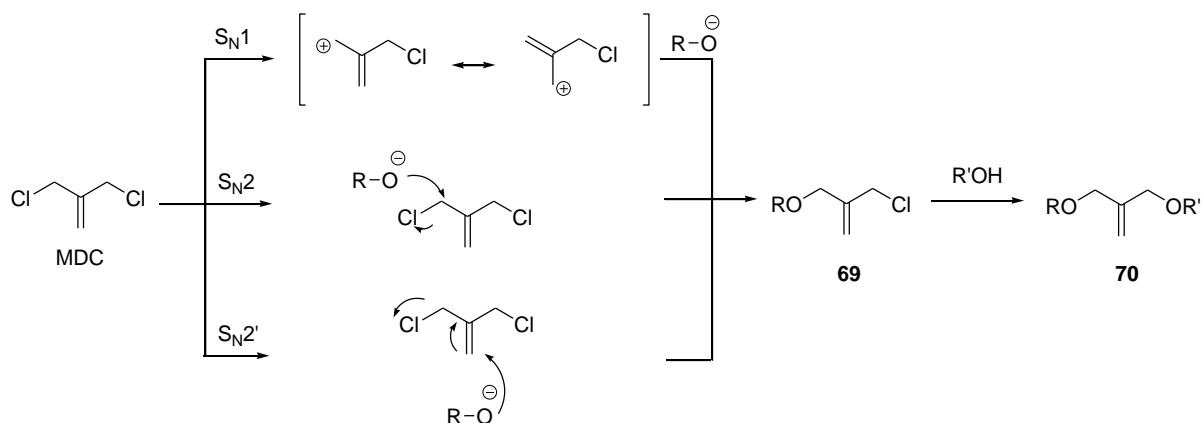


Abbildung 80: Mögliche Reaktionsmechanismen der nukleophilen Substitution an MDC, die alle zu dem gleichen Produkt 69 führen. Durch Zweifachsubstitution wird die divalente Verbindung 70 erhalten, die homogen ($R = R'$) oder heterogen ($R \neq R'$) sein kann.

Durch Steuerung der Reaktionsbedingungen bei der Substitution von MDC können sowohl hertero- als auch homodimere Verbindungen erhalten werden. Die hier

erwünschte Heterofunktionalisierung kann dabei auf unterschiedliche Weise erzielt werden. Entscheidend ist dabei, dass im ersten Schritt eine Einfachsubstitution erfolgt. Dies kann entweder durch den equimolaren Einsatz von MDC und Nukleophil erreicht werden, oder durch Vorlage von MDC im Überschuss und langsames Zutropfen des Nukleophils während der Reaktion. Die anschließende Zweitsubstitution kann dann ohne besondere Reaktionskontrolle ablaufen. Im Arbeitskreis LINDHORST wurden aliphatische Polyether-Dendronen mit MDC als Kernmolekül bereits für die Synthese di- und tetravalenter Glycomimetika verwendet, die als Inhibitoren für Mannose-spezifische Lektine eingesetzt wurden. Dabei wurden sowohl homo- als auch heterodimere Derivate erhalten.^[29,200]

Im Rahmen dieser Arbeit soll nun die Step-by-Step-Heterofunktionalisierung von MDC genutzt werden, um ein heterogenes divalentes Glycothymidin-Derivat darzustellen. Dieses sollte, neben der [2+2]-Cycloaddition der Thymin-Einheiten, eine weitere Möglichkeit bieten, die Flexibilität der zwei beweglichen Glycothymidin-Zweige des Moleküls einzuschränken. Hier war eine Reaktion erforderlich, die in hohen Ausbeuten abläuft, dabei keine Nebenprodukte liefert und unter milden Bedingungen selektiv reagiert. Hier bot sich wieder die Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen und Aziden an, wie sie von SHARPLESS^[163] und MELDAL^[170] zeitgleich publiziert wurde. Fasst man die genannten Überlegungen zu einer Zielverbindung zusammen, so erhält man das divalente, über Methallyldichlorid verbrückte Glycothymidin-Derivat **71**, das einer intramolekularen 1,3-dipolaren Cycloaddition unterworfen werden kann (Abbildung 81). Für die Synthese des Heterodimers **71** werden somit das Azidoglycothymidin **73** und das Alkin **74** benötigt, welche anschließend in einer Williamson-Ethersynthese durch das Methallyldichlorid zum divalenten Derivat **71** verbrückt werden sollen.

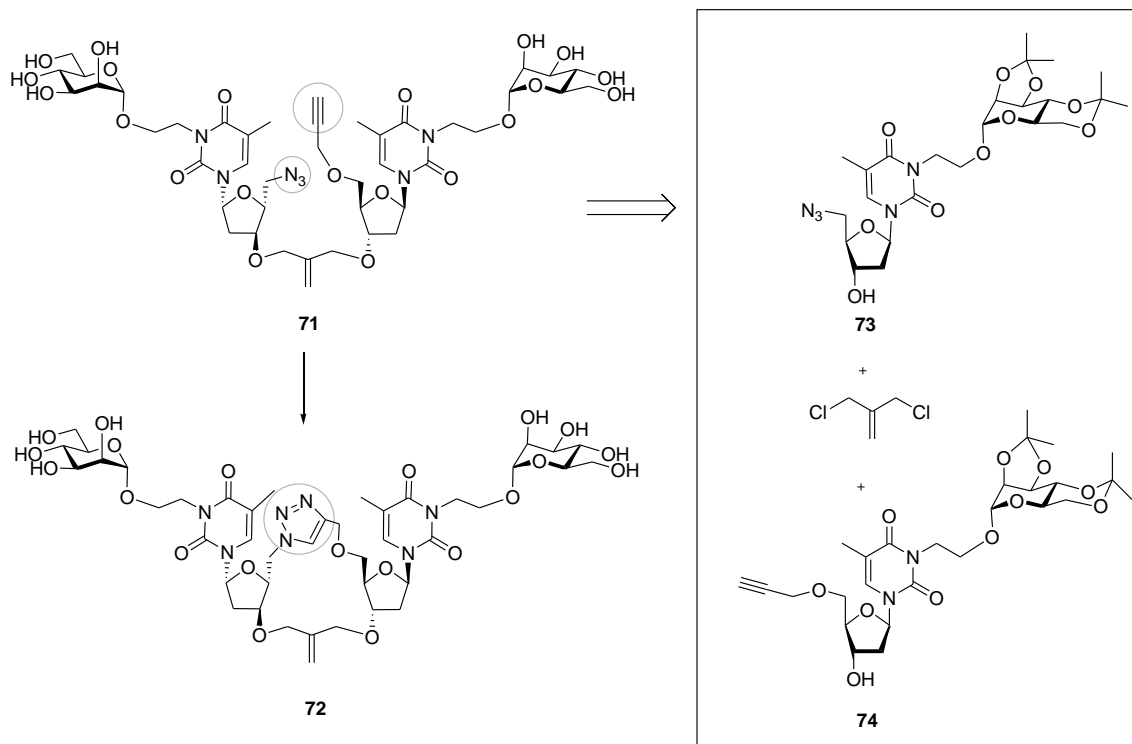


Abbildung 81: Heterodimere Zielverbindung 71, die durch intramolekulare 1,3-dipolare Cycloaddition in ihrer Flexibilität eingeschränkt werden kann. Die Verbindung kann retrosynthetisch in das Azid 73, das Alkin 74 und MDC zerlegt werden.

Das Azidoglycothymidin **73** ließ sich leicht und in guter Ausbeute durch Umsetzung mit dem Isopropyliden-geschützten Brommannosid **11** aus dem Azid **17** darstellen (Abbildung 82).^[113]

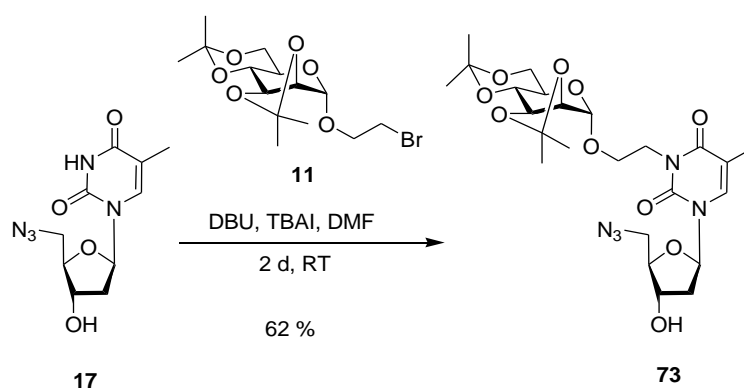


Abbildung 82: Synthese von Azidoglycothymidin **73** über Williamson-Ethersynthese ausgehend von Azidothymidin **17**.

Die Synthese des 5'-Propargyl-Glycothymidins **74** gestaltete sich schwieriger (Abbildung 83).

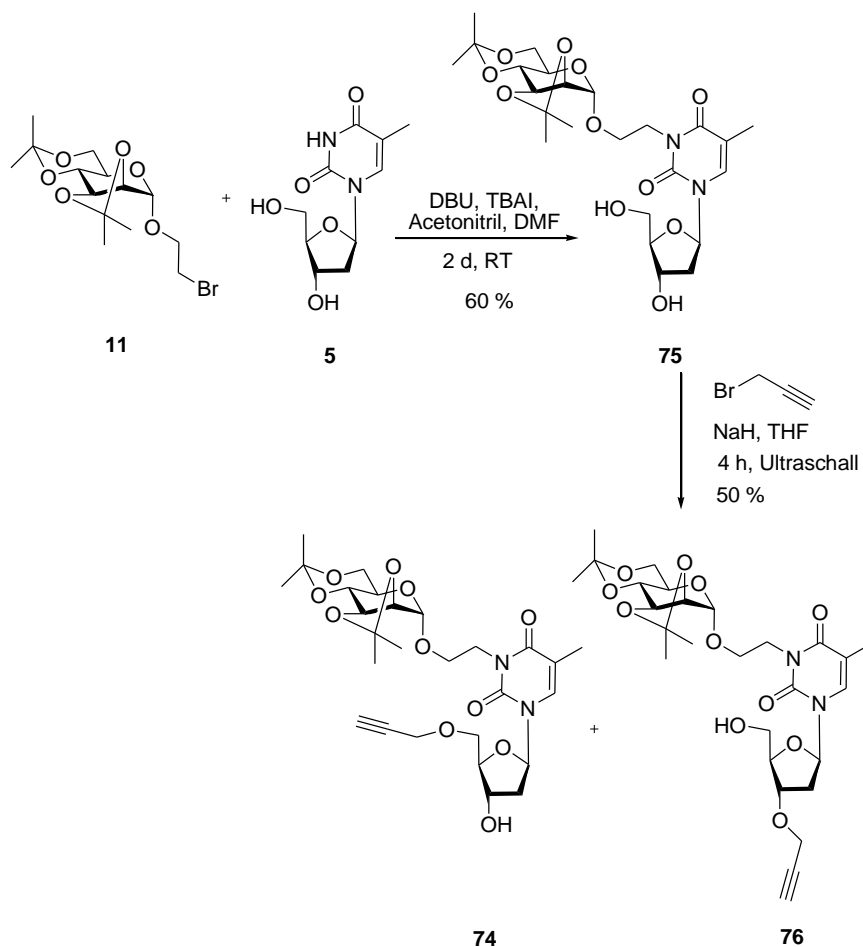


Abbildung 83: 2'-Desoxythymidin (**5**) reagierte in einer Williamson-Ethersynthese mit Bromoethylmannosid **11** zum Glycothymidin **75**. Die Umsetzung von **75** mit Propargylbromid in THF führte zu einem Gemisch aus 3'- und 5'-Propargyl-Glycothymidin.

Wie in Abschnitt 3.6 noch näher erläutert wird, ist die Chemo- und Regioselektivität der Alkylierung von 2'-Desoxythymidin (**5**) stark abhängig von den Reaktionsbedingungen und den Substraten. Für die Darstellung von Alkin **74** wurde 2'-Desoxythymidin (**5**) zunächst mit dem Isopropyliden-geschützten Bromoethylmannosid **11** in 60%iger Ausbeute zum Glycothymidin-Derivat **75** umgesetzt. Die Umsetzung von **75** mit Propargylbromid in THF führte jedoch zu einem Gemisch aus 3'- und 5'-alkyliertem Produkt **74** und **76**.^[113]

Ein weiterer Ansatz die 5'-Position an Thymidin selektiv zu alkylieren war die Verwendung von Bis(tributylzinn)oxid. Bis(tributylzinn)oxid wird z. B. in der

Calixarenchemie dazu genutzt monoalkylierte Calixarene herzustellen.^[201] Das Glycothymidin-Derivat **75** wurde unter Zusatz von Molekularsieb mit Bis(tributylzinn)oxid in Toluol 2 h auf 60 °C erhitzt. Nach Zugabe von Propargylbromid und TBAI wurde weitere 5 d bei 80 °C gerührt. Mit dieser Methode gelang erstmals die selektive 5'-Alkylierung am Thymidin. Trotz langer Reaktionszeit und absolut trockener Bedingungen konnte das Produkt **74** jedoch nur in 19 % Ausbeute erhalten werden (Abbildung 84).

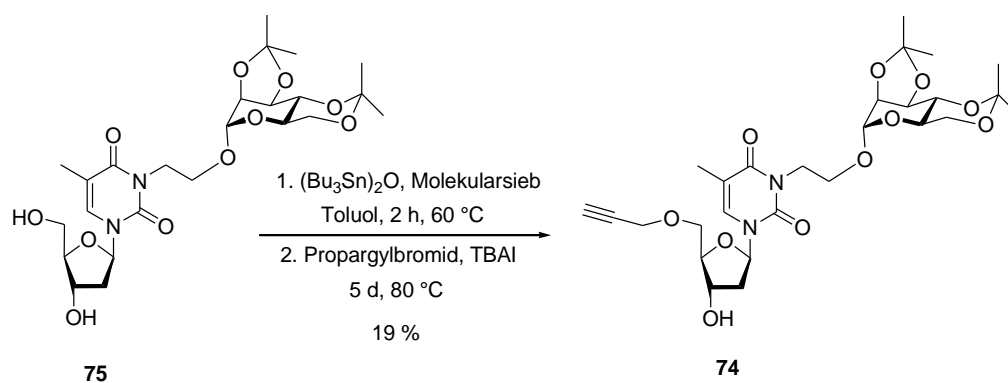


Abbildung 84: Darstellung des Propargyl-Glycothymidins **64** unter Verwendung von Bis(tributylzinn)oxid in einer Stufe ausgehend von Glycothymidin **63**.

Da eine selektive Alkylierung der 5'-Position an der ungeschützten Ribose nur in geringen Ausbeuten erzielt werden konnte, wurde eine Schutzgruppenstrategie für die Synthese von **74** entwickelt. Ausgehend von 2'-Desoxythymidin (**5**) wurden zunächst beide Hydroxygruppen der Ribose mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid geschützt (Abbildung 85). Eine selektive Entschützung der 5'-Position konnte in 49 %iger Ausbeute in einem Essigsäure-Wasser-THF-Gemisch (13:7:3) erzielt werden. Anschließende Veretherung mit dem Isopropyliden-geschützten Bromoethylmannosid **11** führte zum 5'-entschützten Glycothymidin **12**. Dieses wurde in einer Williamson-Ethersynthese mit Propargylbromid umgesetzt. Das 5'-Propargyl-Glycothymidin **77** wurde in 85 % Ausbeute erhalten. Die TBDMS-Entschützung mit TBAF verlief mit 82 %iger Ausbeute und führte zur zweiten Zielverbindung, dem Alkin **74**. **74** wurde ausgehend von 2'-Desoxythymidin (**5**) mit einer Gesamtausbeute von 23 % über fünf Stufen hergestellt.

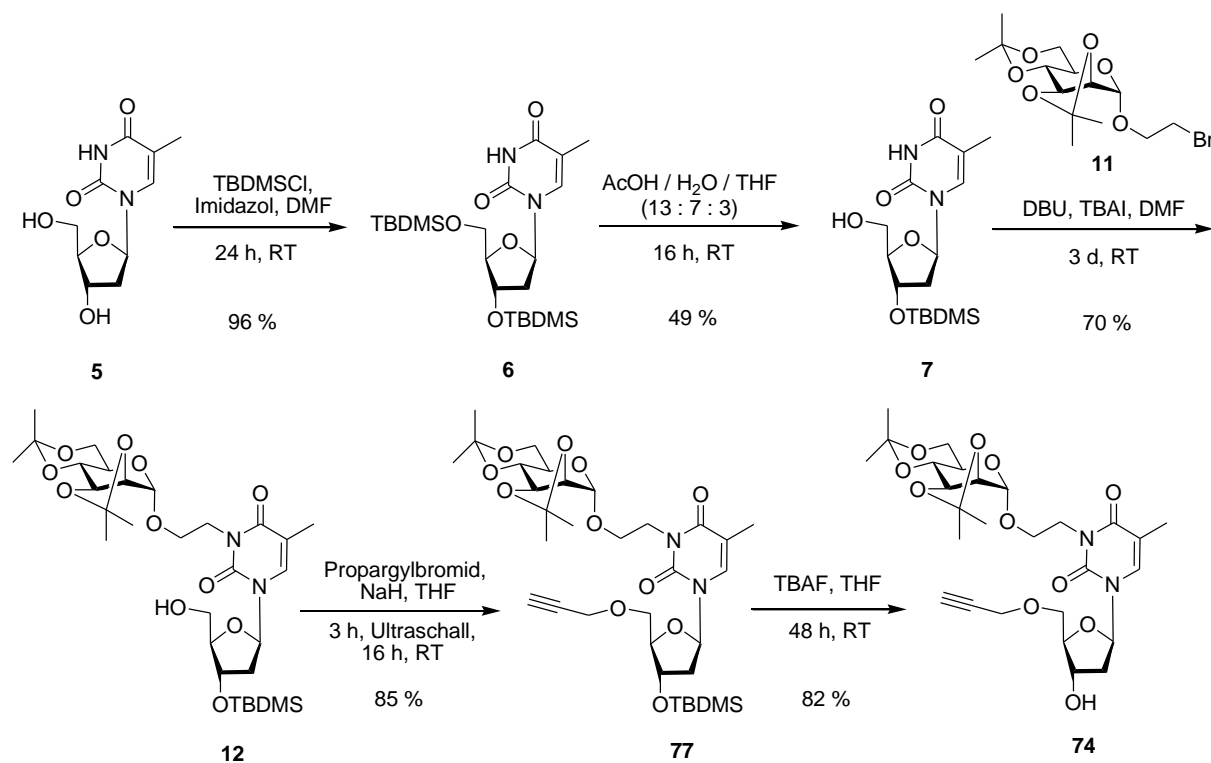


Abbildung 85: Synthese des 5'-Propargyl-Glycothymidins **74** unter Verwendung einer Schutzgruppenstrategie ausgehend von 2'-Desoxythymidin (**5**).

Mit dem Azid **73** und dem Alkin **74** in Händen konnte nun die Synthese des heterogenen divalenten Glycothymidin-Derivats beginnen. Zunächst wurde das Azid **73** in THF mit MDC verethert. Dazu wurde **73** in THF mit Natriumhydrid im Ultraschallbad deprotoniert und direkt im Anschluss langsam zu einem Gemisch von MDC und TBAI zugegeben. Die langsame Zugabe des Azids verhindert eine doppelte Umsetzung am MDC. Das monoalkylierte Produkt **78** wurde in 58 %iger Ausbeute erhalten. Die Umsetzung mit Alkin **74** konnte direkt erfolgen und führte in 59 %iger Ausbeute zur divalenten Verbindung **79**. Die Entschützung der Verbindung **79** darf nicht in stark saurer Lösung erfolgen, da dies zur Spaltung der Verbindung führt. Eine Entschützung in 10 %iger wässriger Trifluoressigsäure-Lösung liefert das entschützte Produkt **80** in 58 %iger Ausbeute (Abbildung 86).

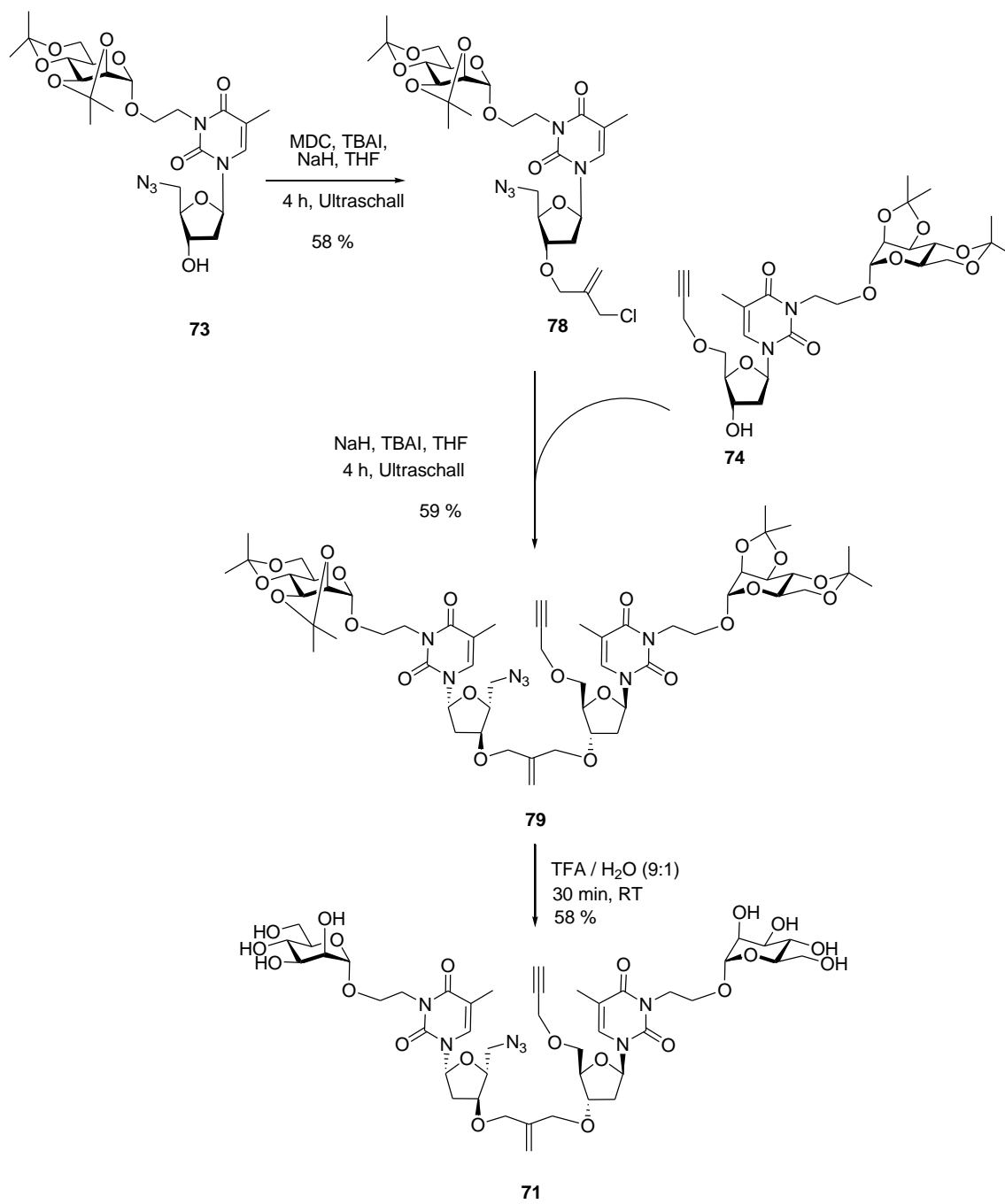


Abbildung 86: Darstellung der heterogenen divalenten Verbindung 71 durch Verknüpfung von Azid 73 und Alkin 74 durch MDC.

Variation der Spacerlänge

Da in diesem System die Flexibilität der „Zucker-Antennen“ eine entscheidende Rolle bei der Zellerkennung spielen kann, sollte durch Variation der Spacerlänge zwischen dem Kernmolekül und dem Glycothymidin die Flexibilität des Systems verändert werden. Der erste Syntheseweg sah eine Allylierung der 3'-Position und eine anschließende Hydroborierung vor. Dies würde zur Einführung eines Propylspacers führen. Das allylierte Produkt **80** wurde in 91 %iger Ausbeute aus dem Azid **73** erhalten (Abbildung 87). Eine Hydroborierung der Verbindung **80** führte jedoch zur Zersetzung. **80** ist unter den Bedingungen der Hydroborierung nicht stabil. Es ist anzunehmen, dass die Doppelbindung der Thymin-Einheit ebenfalls mit dem Hydroborierungsreagenz reagiert.

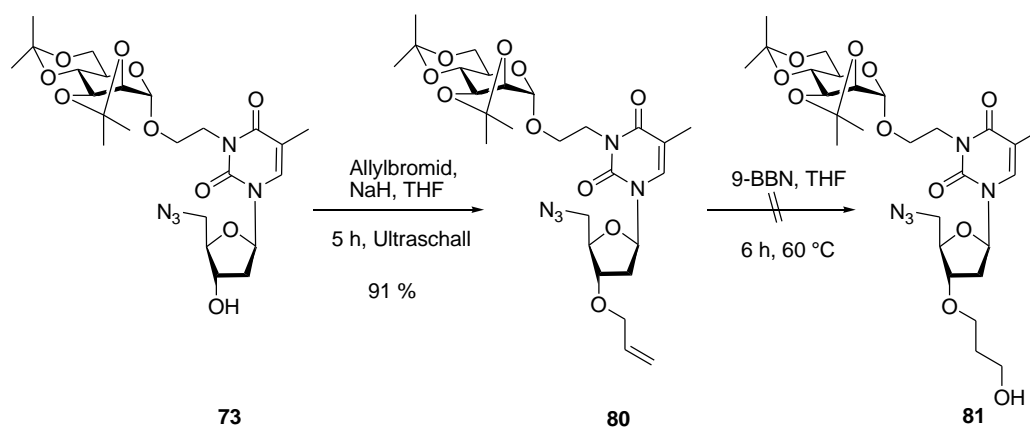


Abbildung 87: Allylierung des Azidoglycothymidins **73** führte in 91 % Ausbeute zum Produkt **80**, anschließende Hydroborierung an der Allyl-Doppelbindung gelang nicht.

Alternativ konnte zur Verlängerung des Spacers mit TBDPS-geschütztem Bromethanol ein Ethylspacer in 3'-Position der Ribose eingeführt werden (Abbildung 88). Ausgehend von 5'-TBDMS-geschütztem Thymidin **41** erfolgte eine Umsetzung mit dem TBDPS-geschützten Bromethanol über eine Williamson-Ethersynthese. Das Produkt **82** konnte in 84 %iger Ausbeute erhalten werden. Nach Entschützung der eingeführten Hydroxygruppe kann diese mit dem Kernmolekül MDC umgesetzt werden. So kann durch die Einführung der Hydroxyethylgruppe ein flexiblerer Glycothymidin-Zweig entstehen. Dieser Syntheseschritt konnte aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

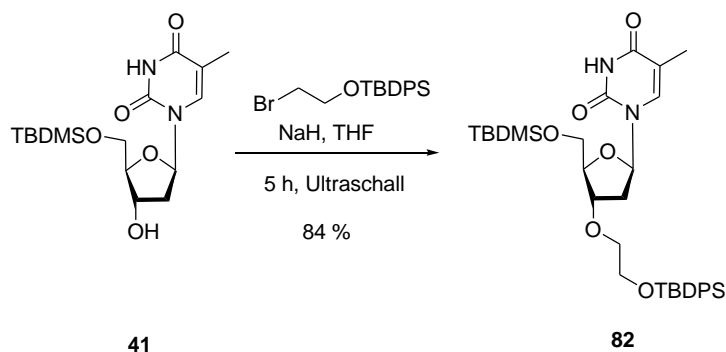


Abbildung 88: Einführung eines Ethylspacers durch Reaktion mit TBDPS-geschütztem Bromethanol an 3'-Position des Thymidin-Derivats **41**.

ZUSAMMENFASSUNG: SYNTHESE EINES HETEROGENEN, DIVALENTEN GLYCOHYMIDIN-DERIVATS AUF BASIS VON POLYETHERDENDRIMERN

Trotz einiger Schwierigkeiten bei der selektiven Funktionalisierung der Thymidin-Derivate konnte eine heterogene divalente Verbindung **71** dargestellt werden, die sowohl einer [2+2]-Cycloaddition durch Bestrahlung bei $\lambda > 295$ nm als auch einer 1,3-dipolaren Cycloaddition von Alkin und Azid unterzogen werden kann. Somit kann die Flexibilität dieses Systems in zwei Stufen verändert werden. Aus Zeitgründen konnten diese Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr gemacht werden.

Eine weitere Veränderung der Flexibilität der „Zucker-Antennen“ bietet sich durch die Variation der Spacerlänge zwischen Glycothymidin und Kernmolekül, welche durch die Einführung eines Ethylspacers in Verbindung **82** realisiert werden konnte.

3.6 Alkylierung von 2'-Desoxythymidin – ein Chemo- und Regioselektivitätsproblem

Aus den Ergebnissen der vorhergehenden Abschnitte geht hervor, dass die Chemo- und Regioselektivität der Alkylierung von 2'-Desoxythymidin (**5**) stark von den jeweiligen Substraten und den gewählten Reaktionsbedingungen abhängig ist. 2'-Desoxythymidin (**5**) hat drei funktionelle Gruppen: die primäre Hydroxygruppe an C5', die sekundäre Hydroxygruppe an C3' und die Imidfunktion in N^3 -Position der Nucleobase (Abbildung 90). Eine wichtige Teilaufgabe dieser Arbeit bestand in der Synthese alkylierter Thymidin-Derivate, wobei in Abschnitt 3.5.3 ein Schwerpunkt auf die selektive 5'-*O*-Alkylierung gelegt wurde. Eine Alkylierung kann prinzipiell an allen drei funktionellen Gruppen des 2'-Desoxythymidins (**5**) stattfinden. Deshalb ist es wichtig, alle Faktoren, welche die Regioselektivität der Alkylierung beeinflussen, zu kennen. In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse, die bei den Experimenten zur chemo- und regioselektiven Alkylierung von Thymidin erhalten wurden, zusammengefasst und mit den in der Literatur beschriebenen Alkylierungsreaktionen verglichen werden. Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann möglicherweise eine Systematik in der Chemo- und Regioselektivität der Alkylierung erkannt werden.

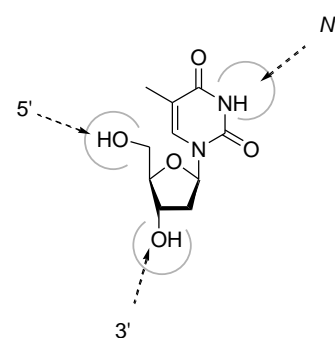


Abbildung 89: Die drei funktionellen Gruppen des 2'-Desoxythymidins (**5**).

Selektive *O*-Alkylierungen gehen immer von einem einfach *O*-geschützten Thymidin-Derivat aus. Die direkte 5'-*O*-Alkylierung des ungeschützten 2'-Desoxythymidins (**5**) gelingt nur mit sterisch anspruchsvollen Alkylierungsreagenzien wie dem Dimethoxytritylchlorid.^[202] Auch die *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe lässt sich selektiv an der 5'-Position der Ribose einführen.^[108] Reaktionen mit Bromoethylmannosiden, Allyl- oder Propargylbromid als elektrophile Reagenz führten jedoch ausschließlich zum N^3 -alkylierten Produkt (Abbildung 90).^[203] Auch bei exakter Reproduktion der 2004 von ZERROUKI et al.^[204] publizierten Reaktionsbedingungen für die selektive 5'-*O*-Allylierung von Thymidin in DMF wurde als einziges Produkt das an N^3 -Position allylierte Derivat **83** erhalten (Abbildung 90). Da die $^1\text{H-NMR}$ -Daten des N^3 -alkylierten Produktes **83** exakt mit den von ZERROUKI veröffentlichten Daten für **84**

übereinstimmen, ist anzunehmen, dass auch ZERROUKI entgegen seiner Behauptung das N^3 -alkylierte Produkt **83** erhalten hat.

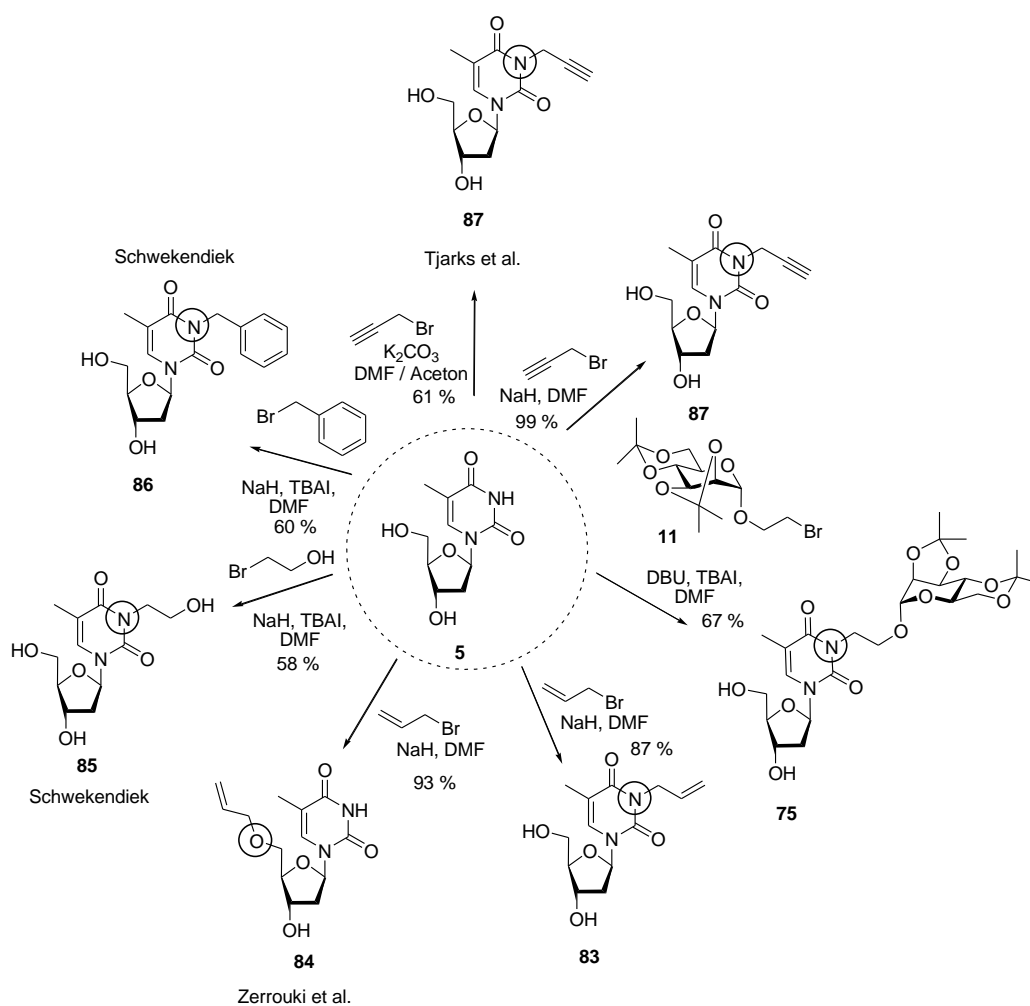


Abbildung 90: Alkylierungen am ungeschützten 2'-Desoxythymidin (**5**) in DMF führen zu N^3 -alkylierten Produkten.

Bei Untersuchungen zur selektiven N^3 - und 5'-*O*-Alkylierung an Nucleinsäuren erhält HOVINEN^[205] bei der Verwendung von THF als Lösungsmittel selektiv das 5'-*O*-alkylierte Produkt, wohingegen Reaktionen, die in DMF durchgeführt werden, zum N^3 -alkylierten Derivat als Hauptprodukt führen. Das 5'-Alkoholat-Ion ist in THF wesentlich reaktiver als das deprotonierte N^3 , da die Nucleophilie des letzteren durch Konjugation mit den Carbonylgruppen an C2 und C4 herabgesetzt ist. Diese Lösungsmittelabhängigkeit der Regioselektivität von Alkylierungsreaktionen an Nucleosiden wird später von ZERROUKI^[206] eingehender untersucht. Dabei wird festgestellt, dass Lösungsmittel mit einer Dielektrizitätskonstante kleiner als 10 selektiv zu *O*-alkylierten Produkten führen,

während Reaktionen in Lösungsmitteln mit einer Dielektrizitätskonstante von größer als 10 ausschließlich das N^3 -alkylierten Produkt ergeben. THF ($\epsilon = 7.58$), das wie Dioxan ($\epsilon = 2.21$) und Dichlormethan ($\epsilon = 8.93$) eine Dielektrizitätskonstante kleiner als 10 hat, führt demnach zur Alkylierung der Hydroxygruppen der Ribose, während DMF ($\epsilon = 37.0$) in jedem Fall das N^3 -alkylierte Derivat liefert. Diese Aussage wird sowohl durch die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse als auch durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Alkylierungsprodukte bestätigt (Abbildung 90).^[207–211] Da 2'-Desoxythymidin (**5**) in keinem der Lösungsmittel mit kleiner Dielektrizitätskonstante löslich ist, kann eine selektive *O*-Alkylierung des ungeschützten 2'-Desoxythymidins (**5**) nicht erfolgen. Durch die Einführung eines geschützten Bromoethylmannosid-Derivats in N^3 -Position wird die Löslichkeit des Thymidin-Derivats in THF gewährleistet; gleichzeitig ist die N^3 -Position für weitere Reaktionen blockiert. Die Umsetzung des Glycothymidin-Derivats **75** mit Propargylbromid in THF führt zu der erwarteten *O*-Alkylierung. Doch auch zwischen den Hydroxylgruppen an 5'- und 3'-Position der Ribose herrscht ein Regioselektivitätsproblem. Es wird ein 1:1-Gemisch der 5'- und 3'-alkylierten Produkte **74** und **76** erhalten (Abbildung 91).^[113] Das Lösungsmittel alleine kann die Probleme bei der regioselektiven Alkylierung also nicht lösen.

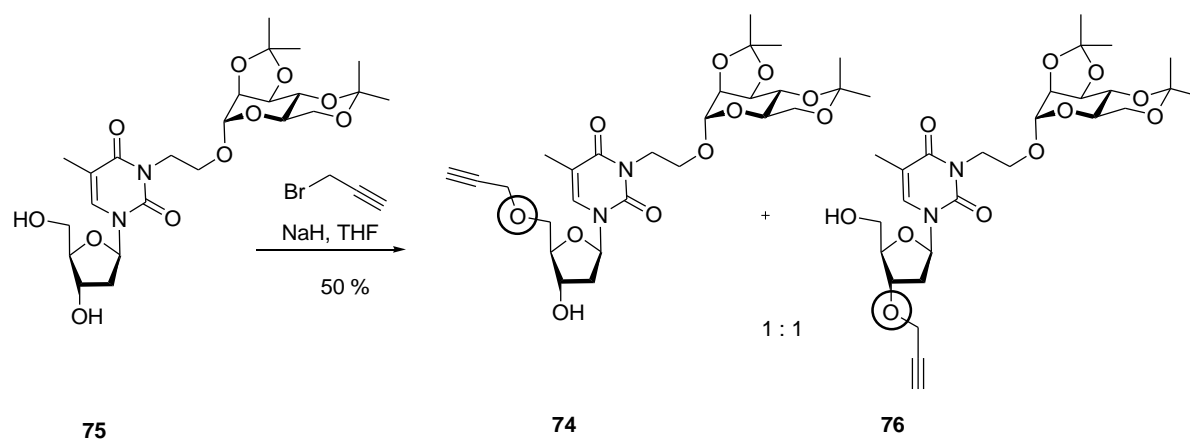
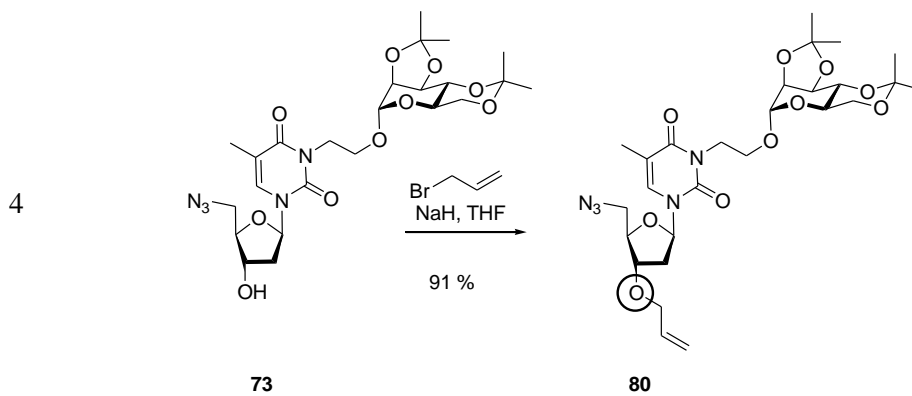
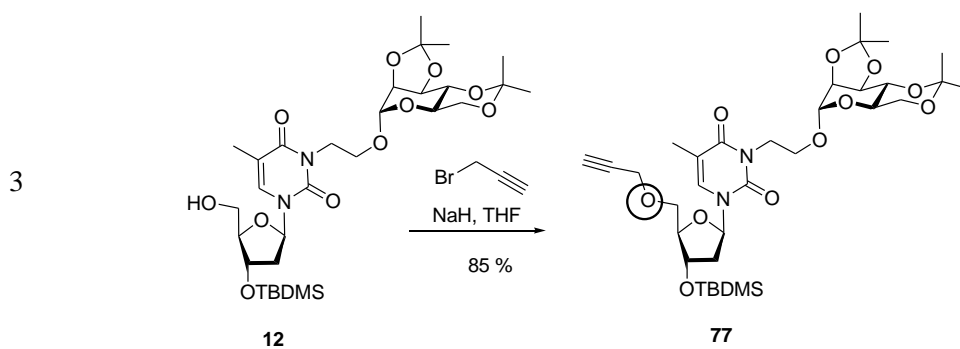
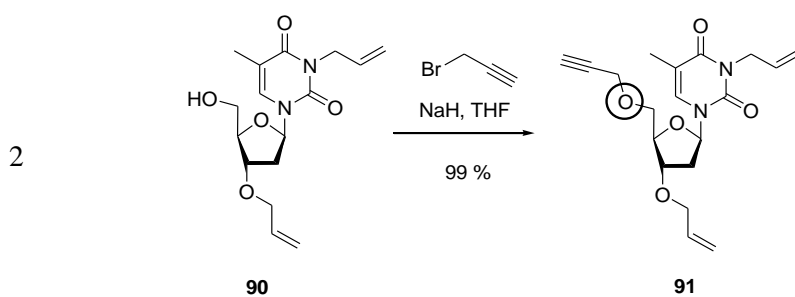
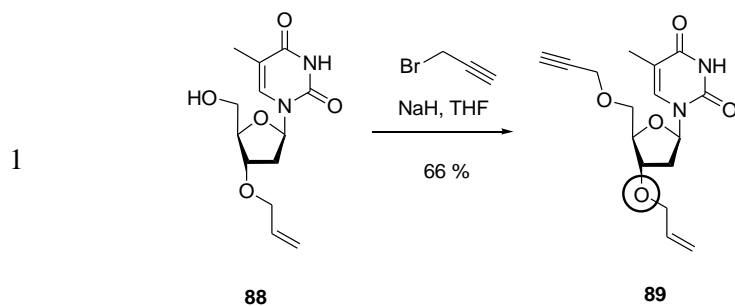


Abbildung 91: Alkylierung von Glycothymidin-Derivat **75** mit Propargylbromid in THF führt zu einem 1:1-Gemisch aus 5'- und 3'-alkyliertem Produkt.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass eine selektive 5'-*O*-Alkylierung am 2'-Desoxythymidin (**5**) ohne Anwendung von Schutzgruppen nicht möglich ist. Selektive *O*-Alkylierungen gehen immer von einfach *O*-geschützten Thymidin-Derivaten aus (Tabelle 1).

Tabelle 1: *O*-Alkylierung am einfach *O*-geschützten Thymidin-Derivat.

Wird die 3'-Hydroxygruppe des 2'-Desoxythymidins (**5**) geschützt, so kann nach anschließender Alkylierung das 5'-alkylierte Produkt in moderaten Ausbeuten isoliert werden (Tabelle 1, Eintrag 1),^[113] es entsteht jedoch in geringen Mengen auch das N³-alkylierte Produkt. Sind sowohl die Hydroxygruppe an 3'-Position als auch N³ geschützt, so erhält man selektiv das 5'-alkylierte Produkt in sehr guten Ausbeuten (Tabelle 1, Eintrag 2 + 3). Das gleiche gilt für die 3'-Alkylierung wenn 5'- und N³-Position geschützt sind. Bei Umsetzung von **73** mit Allylbromid wird das Allylierungsprodukt **80** in 91 % Ausbeute erhalten (Tabelle 1, Eintrag 3). Das Lösungsmittel spielt für die Regioselektivität der Alkylierung folglich eine große Rolle, kann jedoch die Entstehung von Nebenprodukten nicht absolut verhindern. Für eine garantierte Selektivität bei der Alkylierung am 2'-Desoxythymidin (**5**) ist also eine entsprechende Schutzgruppenstrategie erforderlich.

Neben dem Lösungsmittel spielt auch die Menge an Alkylierungsmittel und Base eine Rolle für die Regioselektivität der Alkylierung. Die Allylierung von TBDMS-geschütztem 2'-Desoxythymidin **41** beispielsweise führt bei Verwendung von 1.2 Äquivalenten Allylbromid selektiv zum 3'-O-allylierten Produkt **93** (Abbildung 92).^[113]

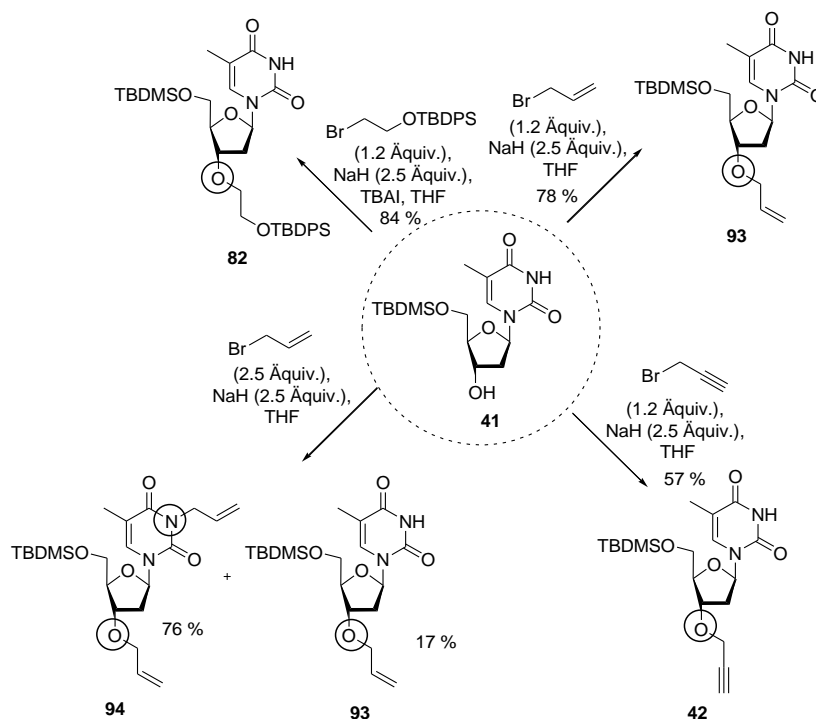


Abbildung 92: Alkylierungsreaktionen an 5'-TBDMS-geschütztem Thymidin **41**.

Neben dem 3'-alkylierten Produkt **93** wurde ausschließlich Edukt isoliert. Bei Verwendung von 2.5 Äquivalenten Allylbromid wird ein Gemisch aus 3'- und N^3 -allyliertem Produkt erhalten (Abbildung 92). Diese Beobachtung wird auch von K. SCHWEKENDIEK bei der Alkylierung von DMT-geschütztem Thymidin in DMF gemacht.^[97] In der Literatur finden sich weitere Beispiele für diese Abhängigkeit.^[206]

Die Verwendung weniger reaktiver Alkylierungsreagenzien als Allyl- oder Propargylbromid gelingt nicht ohne den Zusatz von Tetrabutylammoniumiodid (TBAI), welches durch einen Halogenaustausch die Reaktivität des Alkylierungsreagenzes erhöht. So ist bei der Reaktion von **41** mit TBDMS-geschütztem Bromethanol nur dann eine Umsetzung zu beobachten, wenn TBAI zugesetzt wird (Abbildung 92).

ZUSAMMENFASSUNG: REGIO- UND CHEMOSELEKTIVITÄT BEI DER ALKYLIERUNG VON THYMIDIN

Bei der Alkylierung von Thymidin-Derivaten spielen für die Chemo- und Regioselektivität der Reaktion verschiedene Faktoren eine Rolle. Zum einen ist die Wahl des Lösungsmittels entscheidend: Reaktionen in DMF liefern N^3 -Alkylierung, THF führt zu *O*-Alkylierung. Zum anderen spielt die Menge an zugesetztem Alkylierungsreagenz eine Rolle. Bei zwei Äquivalenten Alkylierungsreagenz tritt unabhängig vom Lösungsmittel Mehrfachalkylierung auf. Weiterhin wurde beobachtet, dass sterisch anspruchsvolle Elektrophile wie Dimethoxytrityl selektiv zu 5'-*O*-Alkylierung führen, während die selektive *O*-Alkylierung am ungechützten 2'-Desoxythymidin (**5**) mit sterisch weniger anspruchsvollen Elektrophilen nicht möglich scheint.

4 Zusammenfassung

Viele Details der Kohlenhydrat-vermittelten zellulären Kommunikation sind bislang unverstanden und einige Fragen wie die nach der konformationellen Kontrolle der Kohlenhydraterkennung noch kaum adressiert. Konformationelle Kontrolle biologischer Prozesse spielt aber andererseits in der Biologie eine große und wohlgewürdigte Rolle. Deshalb hat sich K. SCHWEKENDIEK im Rahmen ihrer Dissertation der Entwicklung photoschaltbarer Glycothymidin-Derivate gewidmet um sie für die Untersuchung konformationeller Kontrolle von Zuckererkennung einsetzbar zu machen.^[97] Glycothymidine können durch Bestrahlung mit Wellenlängen von $\lambda > 295$ nm dimerisiert werden. Dabei bildet sich durch [2+2]-Cycloaddition der Doppelbindungen des Thymins ein Cyclobutandimer. Ein Teil ihrer Arbeit befasste sich mit der Immobilisierung von Glycothymidin-Derivaten auf Polystyroloberflächen, ihrer photoinduzierten Dimerisierung auf dieser Oberfläche und der Untersuchung bakterieller Adhäsion an die entsprechenden Oberflächen. Um die erhaltenen Ergebnisse jedoch eindeutig interpretieren zu können, ist es wichtig, die molekulare Struktur der Glycothymidin-Oberfläche nach der Belichtung zu kennen. Alle Versuche zur direkten Charakterisierung der molekularen Struktur des verwendeten Glycoarrays waren aber damals erfolglos.

An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an. Zunächst wurde versucht, das Resultat der Belichtung von Glycothymidinen auf einer Polystyroloberfläche mit Hilfe der Darstellung von Glycothymidin-Derivaten mit eingebauter Sollbruchstelle zu überprüfen. Dazu wurden Glycothymidin-Derivate über Esterbindungen immobilisiert. Tatsächlich konnten die für die Immobilisierung verwendeten Glycothymidin-Derivate nach basischer Esterspaltung in Lösung nachgewiesen werden. Allerdings erwiesen sich die Ester als zu instabil für den Nachweis der photoinduzierten Cycloaddition auf der Oberfläche. In einem anderen Versuch wurden Glycothymidin-Dimere zunächst in Lösung hergestellt und nach Reinigung für die Immobilisierung verwendet. So ließen sich erstmals Glycoarrays in der bakteriellen Adhäsion vergleichen, die entweder aus den Glycothymidin-Monomeren oder den entsprechenden Dimeren bestanden. Hier zeigten die bakteriellen Adhäsionsstudien eine erhöhte Bindungsaffinität für die Dimer-funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zu den

Monomer-funktionalisierten. Dieses Ergebnis ist wohl am ehesten durch einen Multivalenzeffekt zu erklären, liefert jedoch keine klare Aussage über die Abhängigkeit Kohlenhydrat-vermittelter Adhäsion von der konformationellen Verfügbarkeit der Zuckerliganden.

Für weitergehende Untersuchungen wurden Oberflächen gewählt, die eine spektroskopische Oberflächencharakterisierung zulassen. Deshalb wurde ein Thymidinylthiol-Derivat dargestellt um die Bildung von Glycothymidin-SAMs auf Goldoberflächen zu ermöglichen. Die gebildeten SAMs konnten mit Hilfe der Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) nachgewiesen werden. Weiterhin wurden Quarzoberflächen zur Immobilisierung von Glycothymidin-Derivaten genutzt. Quarzglas hat gegenüber anderen Oberflächenmaterialien den Vorteil, dass es im Bereich der Thyminabsorption (260 nm) UV-durchlässig ist. Dadurch kann die Dimerisierung auf der Oberfläche mit Hilfe der UV-Spektroskopie verfolgt werden. Die Funktionalisierung der Quarzoberflächen erfolgte über kovalente Silanisierung des Glases. Die verwendeten Silane trugen eine Amino-, Azid- oder Aktivester-Funktionalität als terminale Gruppe. Über diese Funktionalität konnten entsprechend Glycothymidin-Derivate mit Isothiocyanat-, Alkin- oder Aminogruppe an die Silane gebunden werden. Eine direkte Immobilisierung des Isothiocyanats auf Amin-terminierte Oberflächen konnte nicht in nachweisbarem Maße durchgeführt werden. Daher wurde Isothiocyanat zuvor in Lösung an das Silan gekuppelt und anschließend immobilisiert (Abbildung 93).

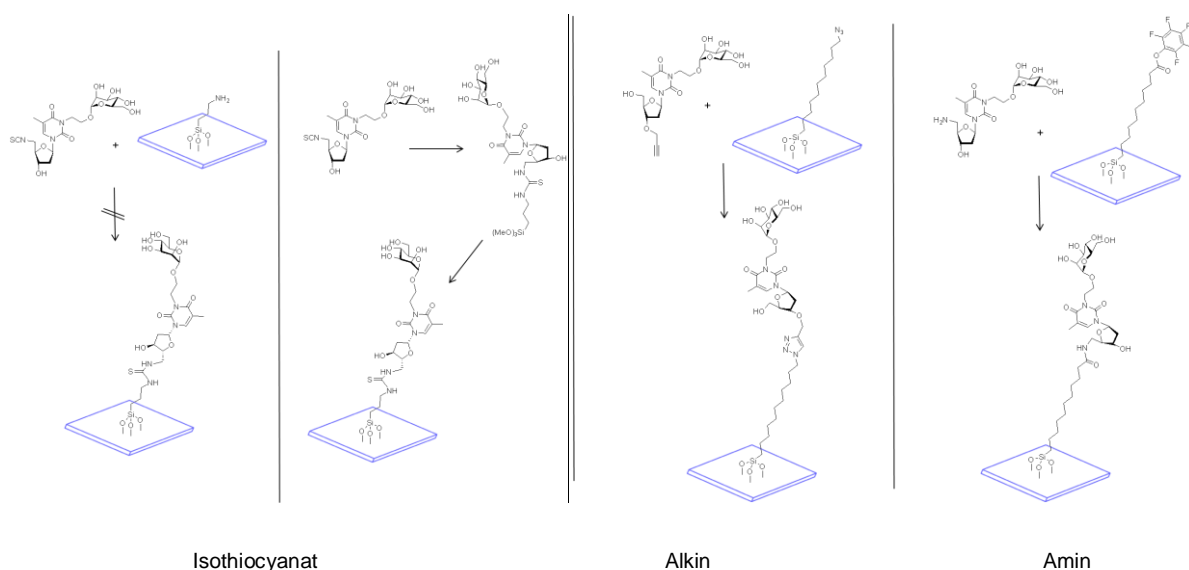


Abbildung 93: Vergleich der Immobilisierungsreaktionen auf Quarzglas. Während das Isothiocyanat vor der Immobilisierung mit dem Silan gekuppelt werden musste, konnten Alkin und Amin direkt auf Azid- bzw. Aktivester-terminierte Oberflächen immobilisiert werden.

Die Alkin- und Amino-funktionalisierten Glycothymidin-Derivate konnten problemlos an zuvor Azid- bzw. Aktivester-terminierte Oberflächen gebunden werden (Abbildung 93). Sowohl die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkin-funktionalisiertem Glycothymidin und Azid-Array, als auch die Peptidkupplung von Amin und Aktivester-terminiertem Array ließen sich mühelos auf der Oberfläche durchführen. Der Nachweis der Oberflächen-Funktionalisierung erfolgte UV-spektroskopisch und mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen. In allen drei Fällen konnte auch die photoinduzierte Dimerisierung der immobilisierten Glycothymidin-Derivate auf der Oberfläche UV-spektroskopisch nachgewiesen werden. Damit ist es erstmals gelungen einen Nachweis für die [2+2]-Cycloaddition der Thymineinheiten auf der Oberfläche zu erbringen. Dieser Nachweis ist essentiell für die Interpretation der Ergebnisse bakterieller Adhäsionsstudien in Bezug auf die Abhängigkeit der Adhäsion vom „Schaltzustand“ der Oberfläche.

Des Weiteren wurden amphiphile Glycothymidin-Derivate dargestellt und über hydrophobe Wechselwirkungen an Oberflächen gebunden. Diese nicht-kovalente Bindung sollte eine laterale Diffusion der Glycokonjugate erlauben, wie sie auch in den natürlich vorkommenden Plasmamembranen möglich ist. Die hydrophobe Beschichtung konnte UV-spektroskopisch nachgewiesen werden.

Neben den monovalenten Glycothymidin-Derivaten wurden außerdem verschiedene divalente Derivate dargestellt, um den Anwendungsbereich von Glycothymidin-Konjugaten zu erweitern. Eine Übersicht der dargestellten divalenten Verbindungen ist in Abbildung 94 zu sehen. Das leicht zugängliche divalente Derivat **56** konnte durch Thioharnstoffkupplung der Amin- und Isothiocyanat-Derivate dargestellt werden. Ein weiteres divalentes Glycothymidin-Derivat konnte mit Hilfe der Dendrimerchemie an fester Phase synthetisiert werden. Die Synthese an fester Phase reduziert den Arbeitsaufwand bei der Synthese und Aufreinigung von Dendrimeren erheblich. Auf diesem Wege wurde das Glycothymidin-Dendron **63** auf PAMAM-Basis in 10 % Ausbeute über sechs Stufen dargestellt. Darüber hinaus konnte ein heterogenes, divalentes Glycothymidin-Derivat auf Basis von aliphatischen Polyetherdendrimeren hergestellt werden. Die Verbindung **71** ermöglicht neben der [2+2]-Cycloaddition der Thymidineinheiten eine weitere Möglichkeit die Flexibilität des Systems einzuschränken: durch intramolekulare 1,3-dipolare Cycloaddition von Azid- und Alkinfunktionalität.

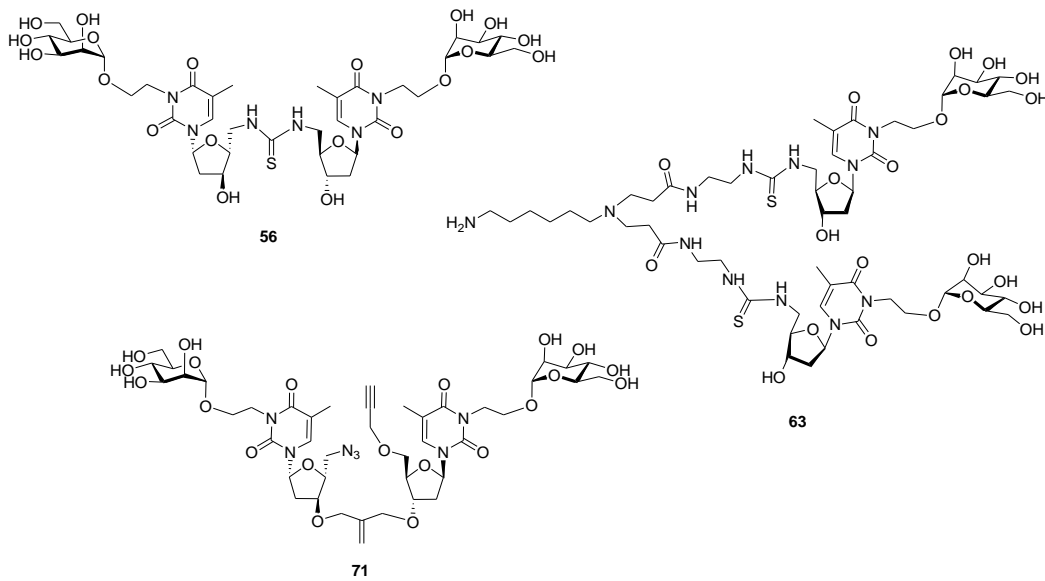


Abbildung 94: Übersicht der dargestellten divalenten Glycothymidin-Derivate.

Damit wurden neue divalente Glycothymidin-Verbindungen hergestellt, die durch intramolekulare [2+2]-Cycloaddition ohne Änderung der Zuckervalenz in ihrer Flexibilität eingeschränkt werden können. Diese sind daher besonders interessant für biologische Untersuchung konformationsabhängiger Kohlenhydraterkennung.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

Alle Reaktionen wurden, soweit nicht anders vermerkt, unter normalen atmosphärischen Bedingungen durchgeführt. Reaktionen unter Schlenkbedingungen wurden in ausgeheizten Apparaturen mit Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zur Isolierung und Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen sowie zur Durchführung und Auswertung aller beschriebenen Experimente wurden die folgenden Materialien und Geräte verwendet:

verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Lösungsmittel und Chemikalien wurden in kommerziell erhältlichen Qualitäten puriss., p.a. oder purum eingesetzt und von den Firmen Fluka, Aldrich, Acros, Lancaster, Applichem und Merck bezogen. Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung durch Destillation gereinigt.

Die verwendeten absolutierten Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Erhitzen unter Rückfluss über einem geeigneten Trockenmittel und anschließender Destillation erhalten oder bereits getrocknet vom Hersteller bezogen.

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| Acetonitril | über Calciumhydrid |
| DCM | über Calciumhydrid |
| 1,4-Dioxan | über Aluminiumoxid |
| DMF | getrocknet vom Hersteller (Fluka) |
| MeOH | über Magnesiumspänen |
| Pyridin | getrocknet vom Hersteller (Fluka) |
| THF | über Lithiumaluminiumhydrid |

Ultraschallgerät

Für die Ultraschallbehandlung wurde ein Sonorex RK100H der Firma Bandelin verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60 GF₂₅₄) bzw. für RP-Dünnschichtchromatographie auf DC-Platten (RP-18 F_{254S}) der Firma Merck und Macherey Nagel verfolgt. Die Lösungsmittelverhältnisse sind in v/v angegeben. Die Detektion UV-aktiver Substanzen erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe der Firma CAMAG mit $\lambda = 254$ nm. Des Weiteren wurden folgende Anfärbereagenzien zur Detektion der Substanzen verwendet:

Schwefelsäure: konz. Schwefelsäure (10 %ige Lösung in Ethanol)

Ninhydrin: 1.5 g Ninhydrin in 500 mL Ethanol und 15 mL Eisessig

Molybdophosphorsäure: Molybdophosphorsäure (10 %ige Lösung in Ethanol)

Kaliumpermanganat: Kaliumpermanganat (0.5 %ige Lösung in Wasser)

Präparative Säulenchromatographie

Die chromatographische Trennung der Substanzen erfolgte mit destillierten Lösungsmitteln an Kieselgel 60 (230-400 mesh, Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma Merck und Macherey Nagel, wobei leichter Überdruck verwendet wurde.

Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie wurde mit destillierten Lösungsmitteln an Sephadex LH-20 und Sephadex G10 der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt.

verwendete Oberflächen

Mikrotiterplatten: Für Adhäsionsassays wurden 96 Well Immobilizer AminoTM F96 MicroWellTM Black Platten der Firma Thermo Fisher Scientific, Nunc verwendet. Hydrophobe Beschichtungen wurden auf 96 Well UV-Star Mikroplatten der Firma Greiner Bio-One durchgeführt.

Gold-Substrate: Für die SAM-Bildung und anschließende IRRAS-Messungen wurden Gold-beschichtete Glasträger mit Titanium-Adhäsionsschicht der Firma EMF Corporation verwendet.

Quarzglas-Substrate: Es wurden Quarzglasobjektträger der Firmen Plano, GPE Scientific Limited und Chemglass Life Science bezogen. Diese wurden in einer Hybridization Cassette (96 Well) der Firma Arrayit verwendet oder auf das Maß 2.5 x 1 cm zugeschnitten und im Reagenzglas beschichtet.

Bestrahlungsexperimente

Bestrahlungsexperimente wurden mit Hilfe einer Quecksilber-Mitteldruck-Tauchlampe TQ-150 (150 Watt) der Firma Hassa und einem Kühlmantel aus Duran, der zugleich als Cut-Off-Filter W295 diente, durchgeführt.

Kaiser-Test^[212]

Für den Kaiser-Test wurden folgende drei Lösungen verwendet a) eine Ninhydrin-Lösung in Ethanol, b) eine Kaliumcyanid-Lösung in Pyridin und c) eine Phenol-Lösung in Ethanol. Je 2 Tropfen der Lösung wurden mit einer Probe des funktionalisierten Trägermaterials erhitzt. Freie Amine auf der Oberfläche werden durch eine Blaufärbung der Lösung angezeigt (positiv). In Abwesenheit von Aminen färbt sich die Lösung gelb (negativ).

Nomenklatur

Die systematische Benennung der chemischen Verbindungen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach dem Nomenklaturprinzip der IUPAC-Kommission. Für die NMR-Auswertung sind entgegen der IUPAC-Nomenklatur die Signale des Thymins, der Ribose und der Mannose aus Gründen der Übersichtlichkeit mit H_{Thy} und C_{Thy} , H' und C' bzw. H_{Man} und C_{Man} bezeichnet.

Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-spektroskopischen Messungen erfolgten an den Geräten ARX-300 (300.13 MHz für ^1H), DRX-500 (500.13 MHz für ^1H , 125.77 MHz für ^{13}C) und AV-600 (600.13 MHz für ^1H , 150.92 MHz für ^{13}C) der Firma Bruker bei 298 K, wenn nicht anders angegeben. Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe weiterer ein- und zweidimensionaler

NMR-spektroskopischer Methoden (DEPT, ^1H - ^1H -COSY, HSQC und HMBC) vorgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu TMS (interner Standard) angegeben. Kopplungskonstanten (J) werden in Hertz (Hz) angegeben. Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe der jeweiligen Lösungsmittelsignale, im Fall von CDCl_3 wurde TMS als interner Standard verwendet.

| | | |
|----------------------|-----------------|----------------------------------|
| CDCl_3 | ^1H | 0.000 ppm (s, interner Standard) |
| | ^{13}C | 77.000 ppm (t) |
| MeOH-d_4 | ^1H | 3.310 ppm (quint) |
| | ^{13}C | 49.050 ppm (sept) |
| DMSO-d_6 | ^1H | 2.500 ppm (quint) |
| | ^{13}C | 30.830 ppm (sept) |
| D_2O | ^1H | 4.650 ppm (s) |

Massenspektrometrie

MALDI-ToF-Massenspektren wurden an einem Biflex-III-Gerät der Firma Bruker-Daltonics aufgenommen. Als Matrices wurden DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) in Acetonitril/Wasser (1:1) mit einem Zusatz von 0.1 % TFA und CCA (α -Cyano-4-hydroxymizsäure) in Acetonitril/Wasser (1:1) verwendet. Die Ionisierung erfolgte mit einem Stickstofflaser bei 337 nm mit 19 kV Beschleunigungsspannung.

ESI-Massenspektren wurden auf einem Mariner ESI-ToF 5280 der Firma Applied Biosystems aufgenommen.

UV/Vis-Spektroskopie

Die UV-Vis-Spektren wurden mit dem UV-Vis-Spektrometer Lambda 14 der Firma Perkin-Elmer aufgenommen. Für Lösungen wurden Quarzglas-Küvetten mit einem Durchmesser von 1 cm verwendet.

Zur Aufnahme von UV-Vis-Spektren beschichteter Oberflächen wurde zusätzlich ein Infinite F200-Reader der Firma Tecan mit der Magellan-Steuersoftware und einem Absorptions-Filter ($\lambda = 260\text{nm}$) verwendet.

HPLC

Analytische Trennung per HPLC wurde auf einer LaChrom-Anlage der Firma Merck durchgeführt: Interface D-7000, Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, Column Oven L-7350 Dioden-Array-Detektor L-7455, RI-Detektor L-7490. Es wurde eine NH₂-RP-Säule der Firma Macherey Nagel verwendet.

Infrarot-Spektroskopie

Die IR-spektroskopische Charakterisierung erfolgte an einem FT-IR-Spektrometer Paragon 1000 der Firma Perkin Elmer. Zur Probenvorbereitung wurde eine Golden-Gate-Diamant-ATR-Einheit mit Saphirstempel verwendet. Die Bandenlagen sind in Wellenlängen (cm⁻¹) angegeben.

Drehwerte

Drehwerte wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 (Natrium-D-Linie: 589 nm, Küvettenlänge: 1 dm) in den jeweils angegebenen Lösungsmitteln vermessen. Die Drehwerte α sind in [mL · (mg · dm)⁻¹] und die Konzentrationen c in [mg · mL⁻¹] angegeben. Die Temperatur der Lösung für die jeweilige Messung ist hinter der Klammer in °C angegeben.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden in der analytischen Abteilung des Instituts für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel an einem Euro-EA, Elemental Analyser der Firma Euro Vector durchgeführt.

Kontaktwinkelmessungen

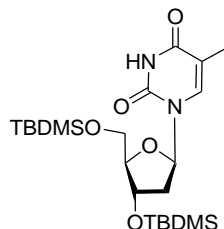
Kontaktwinkelmessungen wurden an einem Easy Drop Tropfenkonturanalyse-System der Krüss GmbH durchgeführt und über das Kreissegmentverfahren der dazugehörigen Drop Shape Analysis Software DSA2 ausgewertet.

Fluoreszenzmessungen

Fluoreszenzmessungen zur Auswertung der biologischen Tests wurde an einem Infinite F200-Reader der Firma Tecan mit der Magellan-Steuersoftware durchgeführt.

5.2 Einzelvorschriften

5',3'-Di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin (6)^[108]



Zu einer Lösung von 2'-Desoxythymidin (**5**) (1.00 g, 4.13 mmol) in abs. Dimethylformamid (18 mL) wurden Imidazol (1.69 g, 24.8 mmol) und TBDMS-Cl (1.87 g, 12.4 mmol) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 4 d bei RT gerührt. Es wurde mit Dichlormethan (50 mL) verdünnt und dreimal mit je 40 mL Wasser gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc. 1 : 1) gereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.87 g (3.97 mmol, M = 470.75 g/mol), 96 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 1:1): 0.40;

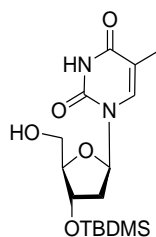
¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 11.30 (s, 1H, N³H_{Thy}), 7.42 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.16 (dd, ³J_{1', 2'a} = 6.1 Hz, ³J_{1', 2'b} = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 4.37 (ddd, ³J_{3',4'} = 2.9 Hz, ³J_{2',b,3'} = 2.9 Hz, ³J_{2',a,3'} = 5.8 Hz, 1H, H-3'), 3.79 (ddd, ³J_{3',4'} = 3.9 Hz, ³J_{4',5'a} = 3.9 Hz, ³J_{4',5'b} = 3.9 Hz, 1H, H-4'), 3.76 (dd, ³J_{4',5'a} = 4.3 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 11.2 Hz, 1H, H-5'a), 3.71 (dd, ³J_{4',5'b} = 3.8 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 11.1 Hz, 1H, H-5'b), 2.20 (ddd, ³J_{2',a,3'} = 6.2 Hz, ³J_{1',2'a} = 8.0 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.6 Hz, 1H, H-2'a), 2.07 (ddd, ³J_{2',b,3'} = 2.8 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.0 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.3 Hz, 1H, H-2'b), 1.78 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.0 Hz, 3H, CH_{3Thy}), 0.89 (s, 18H, 2x SiC(CH₃)₃), 0.12 (s, 12H, 2x Si(CH₃)₂) ppm;

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150 MHz): δ = 164.1 (C_{4Thy}), 150.8 (C_{2Thy}), 136.0 (C_{6Thy}), 110.0 (C_{5Thy}), 87.2 (C_{4'}), 84.2 (C_{1'}), 72.5 (C_{3'}), 63.2 (C_{5'}), 39.6 (C_{2'}), 26.8, 26.3, 26.2, 26.1 (2x SiC(CH₃)₃), 18.5, 18.1 (2x SiC(CH₃)₃), 12.7 (CH_{3Thy}), -2.8, -4.3, -4.5, -5.0 (2x Si(CH₃)₂) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 493.253 $[M + Na]^+$; gef.: m/z 493.259 $[M + Na]^+$;

EA $C_{22}H_{42}N_2O_5Si_2$ ($M = 470.75$ g/mol): ber.: C 56.13, H 8.99, N 5.95; gef.: C 56.18, H 9.11, N 6.06.

3'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin (7)^[109]



Di-*tert*-butyldimethylsilylthymidin **6** (300 mg, 0.637 mmol) wurde in AcOH / H₂O / THF (13 : 7 : 3; 5 mL) gelöst und 15 h bei RT gerührt. Es wurde mit festem NaHCO₃ neutralisiert. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan extrahiert, die org. Phase mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc, 6 : 4 → 1 : 1) gereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 110 mg (0.309 mmol, $M = 356.49$ g/mol), 49 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 3:7): 0.36;

Schmp.: 110 °C;

¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz): $\delta = 7.78$ (q, $^4J_{6,CH_3} = 1.3$ Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.26 (dd~t, $^3J_{1',2'a} = 6.7$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 6.7$ Hz, 1H, H-1'), 4.51 (ddd, $^3J_{3',4'} = 3.3$ Hz, $^3J_{2',3'} = 4.4$ Hz, $^3J_{2'a,3'} = 8.9$ Hz, 1H, H-3'), 3.89 (ddd, $^3J_{3',4'} = 3.4$ Hz, $^3J_{4',5'a} = 3.4$ Hz, $^3J_{4',5'b} = 3.4$ Hz, 1H, H-4'), 3.77 (dd, $^3J_{4',5'a} = 3.4$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 12.1$ Hz, 1H, H-5'a), 3.70 (dd, $^3J_{4',5'b} = 3.6$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 12.0$ Hz, 1H, H-5'b), 2.20 (m, 2H, H-2'), 1.88 (d, $^4J_{6,CH_3} = 1.2$ Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 0.93 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.12 (s, 6H, Si(CH₃)₂) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz): $\delta = 166.4$ (C4_{Thy}), 152.4 (C2_{Thy}), 138.1 (C6_{Thy}), 111.6 (C5_{Thy}), 89.4 ($\text{C4}'$), 86.3 ($\text{C1}'$), 73.6 ($\text{C3}'$), 62.6 ($\text{C5}'$), 41.7 ($\text{C2}'$), 26.2 ($3 \times \text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.8 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 12.4 (CH_3_{Thy}), -4.6 ($\text{Si}(\text{CH}_3)$), -4.8 ($\text{Si}(\text{CH}_3)$) ppm;

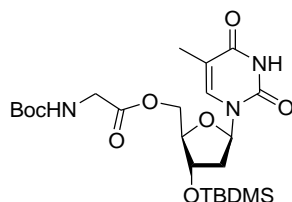
ESI-MS: ber.: m/z 379.166 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; gef.: m/z 379.164 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu} = 3474, 2931, 2859, 1694, 1668, 1473, 1278, 1254, 1109, 1089, 1057, 1035, 1015, 962, 921, 884, 835, 675 \text{ cm}^{-1}$.

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +27.1$ ($c = 11.2 \text{ mg/mL}$, CH_2Cl_2);

EA $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ ($M = 356.49 \text{ g/mol}$): ber.: C 53.91, H 7.92, N 7.86; gef.: C 53.16, H 7.98, N 7.77.

5'-O-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-glycinester)-3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin (8)



tert-Butyldimethylsilylthymidin **7** (134 mg, 0.376 mmol) und Triethylamin (312 μL , 2.26 mmol) wurden in abs. Dioxan (1 mL) gelöst, mit Boc-Glycin (329 mg, 1.88 mmol), DCC (200 mg, 1.88 mmol) und DMAP (3.6 mg, 0.03 mmol) versetzt und 2.5 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle!). Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt. Der Rückstand wurde in ges. NaHCO_3 -Lösung aufgenommen, mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten org. Phasen über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EE, 6 : 4) und anschließend mittels Gelpermeationschromatographie (Eluent: EE) an Sephadex G 10 gereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 148 mg (0.288 mmol, $M = 513.66 \text{ g/mol}$), 77 %.

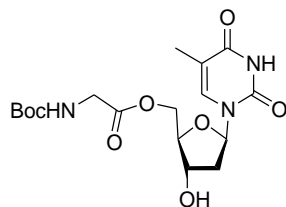
R_F-Wert (Cy : EtOAc; 3:7): 0.57;

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.94 (m, 1H, N³H_{Thy}), 7.21 (s, 1H, H-6_{Thy}), 6.22 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.6 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.12 (m, 1H, BocNH), 4.38 (dd, ³J_{4',5'a} = 4.7 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 12.1 Hz, 1H, H-5'a), 4.33 (dd, ³J_{4',5'b} = 3.6 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 12.0 Hz, 1H, H-5'b), 4.35-4.33 (m, 1H, H-3'), 4.05 (ddd~q, ³J_{3',4'} = 3.9 Hz, ³J_{4',5'a} = 3.9 Hz, ³J_{4',5'b} = 3.9 Hz, 1H, H-4'), 4.01-3.90 (m, 2H, BocNHCH₂), 2.30 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 3.8 Hz, ³J_{1',2'a} = 6.4 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.5 Hz, 1H, H-2'a), 2.18-2.11 (m, 1H, H-2'b), 1.95 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.0 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.08 (s, 6H, Si(CH₃)₂) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 170.2 (CH₂C(O)), 163.7 (C4_{Thy}), 155.7 (OC(O)Boc), 150.2 (C2_{Thy}), 135.4 (C6_{Thy}), 111.2 (C5_{Thy}), 85.4 (C1'), 84.4 (C4'), 80.3 (C(CH₃)₃), 71.8 (C3'), 64.1 (C5'), 42.5 (BocNHCH₂), 40.6 (C2'), 28.3 (C(CH₃)₃), 25.7 (SiC(CH₃)₃), 17.9 (SiC(CH₃)₃), 12.6 (CH₃_{Thy}), -4.7 (Si(CH₃)₂), -4.9 (Si(CH₃)₂) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 536.240 [M + Na]⁺; gef.: m/z 536.240 [M + Na]⁺.

5'-O-(N-tert-Butyloxycarbonyl-glycinester)-2'-desoxythymidin (9)



Der TBDMS-geschützte Ester **8** (100 mg, 0.195 mmol) wurde in Dichlormethan (1 mL) gelöst, mit Trifluoressigsäure (0.3 mL) versetzt und 30 min. bei RT gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit Et₃N neutralisiert und das freie Amin *in situ* mit Boc-anhydrid (142 mg) geschützt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Methanol gelöst, auf Kieselgel absorbiert und mittels zweimaliger Säulenchromatographie (EE : Cy, 9 : 1 → EE und EE : MeOH, 9 : 1) gereinigt.

Ausbeute: 40 mg (0.10 mmol, M = 399.40 g/mol), 51 %;

Alternative Synthese:

Der TBDMS-geschützte Ester **7** (112 mg, 0.218 mmol) wurde in Ethanol (3 mL) gelöst, mit konz. Salzsäure (120 μ L) versetzt und 6 h bei RT gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde

das Reaktionsgemisch mit Et₃N neutralisiert und das freie Amin *in situ* mit Boc-anhydrid (60 mg) geschützt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Methanol gelöst, auf Kieselgel absorbiert und mittels zweimaliger Säulenchromatographie (EE : Cy, 9 : 1 → EE und EE : MeOH, 9 : 1) gereinigt.

Ausbeute: 33.1 mg (0.083 mmol, M = 399.40 g/mol), 38 %.

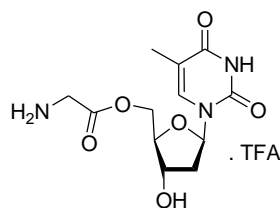
R_f-Wert (EtOAc): 0.42;

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 7.52 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.29 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 7.1 Hz, ³J_{1',2'b} = 7.1 Hz, 1H, H-1'), 4.43 (dd, ³J_{4',5'a} = 5.2 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 12.0 Hz, 1H, H-5'a), 4.45-4.39 (m, 2H, H-3', H-5'b), 4.10 (ddd, ³J_{3',4'} = 3.5 Hz, ³J_{4',5'a} = 5.1 Hz, ³J_{4',5'b} = 3.5 Hz, 1H, H-4'), 3.91-3.84 (m, 2H, BocNHCH₂), 2.33-2.24 (m, 2H, H-2'), 1.94 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.1 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ = 171.9 (CH₂C(O)), 166.4 (C4_{Thy}), 158.5 (OC(O)Boc), 152.3 (C2_{Thy}), 137.6 (C6_{Thy}), 111.9 (C5_{Thy}), 86.5 (C1'), 85.7 (C4'), 80.8 (C(CH₃)₃), 72.3 (C3'), 65.6 (C5'), 43.2 (BocNHCH₂), 40.5 (C2'), 28.7 (C(CH₃)₃), 12.5 (CH₃_{Thy}) ppm;

ESI-MS: ber.: *m/z* 422.154 [M + Na]⁺; gef.: *m/z* 422.170 [M + Na]⁺.

5'-O-Glycinester-2'-desoxythymidinyltrifluoroacetat (10)



Der Boc-geschützte Ester **9** (23 mg, 0.058 mmol) wurde in Dichlormethan (1 mL) gelöst und mit TFA (0.3 mL) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde ohne Hitze *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde als weißes Lyophilisat erhalten.

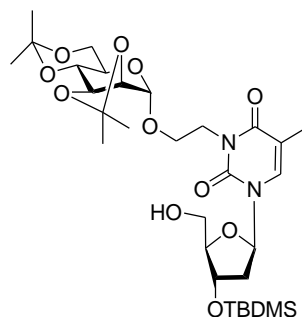
Ausbeute: 22.9 mg (0.0576 mmol, M = 396.30 g/mol), quant.

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 7.45 (q, $^4J_{6,\text{CH}_3}$ = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.22 (dd~t, $^3J_{1',2'a}$ = 6.8 Hz, $^3J_{1',2'b}$ = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 4.51 (dd, $^3J_{4',5'a}$ = 6.4 Hz, $^2J_{5'a,5'b}$ = 11.8 Hz, 1H, H-5'a), 4.46 (dd, $^3J_{4',5'b}$ = 3.8 Hz, $^2J_{5'a,5'b}$ = 11.8 Hz, 1H, H-5'b), 4.39 (ddd, $^3J_{3',4'}$ = 4.2 Hz, $^3J_{2'b,3'}$ = 4.2 Hz, $^3J_{2'a,3'}$ = 6.8 Hz, 1H, H-3'), 4.06 (ddd, $^3J_{3',4'}$ = 3.9 Hz, $^3J_{4',5'a}$ = 6.4 Hz, $^3J_{4',5'b}$ = 3.9 Hz, 1H, H-4'), 3.94-3.83 (m, 2H, H₂NCH₂), 2.36 (ddd, $^3J_{2'a,3'}$ = 7.0 Hz, $^3J_{1',2'a}$ = 7.0 Hz, $^2J_{2'a,2'b}$ = 13.9 Hz, 1H, H-2'a), 2.28 (ddd, $^3J_{2'b,3'}$ = 4.1 Hz, $^3J_{1',2'b}$ = 6.7 Hz, $^2J_{2'a,2'b}$ = 13.9 Hz, 1H, H-2'b), 1.90 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3}$ = 1.3 Hz, 3H, CH₃_{Thy}) ppm;

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ = 168.5 (CH₂C(O)), 166.3 (C₄_{Thy}), 152.2 (C₂_{Thy}), 138.2 (C₆_{Thy}), 111.9 (C₅_{Thy}), 87.0 (C1'), 85.1 (C4'), 72.0 (C3'), 66.7 (C5'), 41.0 (H₂NCH₂), 40.0 (C2'), 12.4 (CH₃_{Thy}) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 300.120 [M + H]⁺; gef.: m/z 300.103 [M + H]⁺.

***N*³-(2-(2,3;4,6-Di-*O*-isopropyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-3'-*O*-tert-butylidimethylsilyl-2'-desoxythymidin (12)**



Das TBDMS-geschützte Thymidinderivat **7** (400 mg, 1.12 mmol) wurde in abs. Dimethylformamid (10 mL) gelöst, mit Bromethylmannosid (**11**, 412 mg, 1.12 mmol), DBU (168 μ L, 1.12 mmol) und TBAI (415 mg, 1.12 mmol) versetzt und 4 d bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Filtrat eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc, 7 : 3) gereinigt.

Ausbeute: 508 mg (0.790 mmol, M = 642.81 g/mol), 70 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 1 : 1): 0.36;

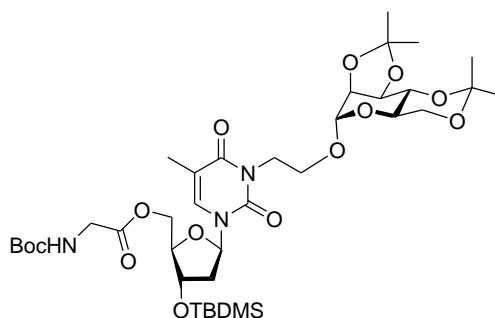
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.28 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.29 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.8 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 5.00 (s, 1H, H-1_{Man}), 4.52 (ddd~dt, ³J_{2'a,3'} = 4.4 Hz, ³J_{3',4'} = 4.4 Hz, ³J_{2'b,3'} = 6.8 Hz, 1H, H-3'), 4.48 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 5.5 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 9.1 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.8 Hz, 1H, N³CH₂a), 4.14 (d, ³J_{2,3} = 5.6 Hz, 1H, H-2_{Man}), 4.03 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 5.6 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 8.0 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 13.5 Hz, 1H, OCH₂a), 4.01-3.92 (m, 2H, N³CH₂b, H-3_{Man}), 3.89-3.84 (m, 3H, H-4', H-5'a, H-6a_{Man}), 3.71-3.64 (m, 4H, H-4_{Man}, H-6b_{Man}, OCH₂b, H-5'b) 3.22 (ddd, ³J_{5,6a} = 5.6 Hz, ³J_{4,5} = 10.4 Hz, ³J_{5,6b} = 10.4 Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.33 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 6.8 Hz, ³J_{1',2'a} = 6.8 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.5 Hz, 1H, H-2'a), 2.26 (ddd, ³J_{1',2'b} = 4.5 Hz, ³J_{2'b,3'} = 7.0 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.6 Hz, 1H, H-2'b), 1.96 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.52 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.48 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.40 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.33 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.09 (s, 6H, Si(CH₃)₂) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ = 163.2 (C₄_{Thy}), 150.93 (C₂_{Thy}), 134.7 (C₆_{Thy}), 110.6 (C₅_{Thy}), 109.4 (C_{Isopr}), 99.7 (C_{Isopr}), 96.9 (C₁_{Man}), 87.3 (C_{1'}), 86.3 (C_{4'}), 75.9 (C₂_{Man}), 74.7 (C₃_{Man}), 72.6 (C₄_{Man}), 71.2 (C_{3'}), 63.9 (OCH₂), 61.9 (C₆_{Man}), 61.6 (C₅_{Man}), 61.3 (C_{5'}), 40.3 (C_{2'}), 40.1 (N³CH₂), 29.0, 28.2, 26.1 (3x CH₃_{Isopr}), 25.7 (3x SiC(CH₃)₃), 18.8 (CH₃_{Isopr}), 17.9 (SiC(CH₃)₃), 13.4 (CH₃_{Thy}), -4.7, -4.8 (2x Si(CH₃)) ppm;

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2932, 1702, 1639, 1466, 1370, 1251, 1087, 1023, 834, 763, 673, 520 cm⁻¹;

ESI-MS: ber.: m/z 665.308 [M + Na]⁺; gef.: m/z 665.306 [M + Na]⁺.

N³-(2-(2,3;4,6-Di-O-isopropyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-O-(N-tert-butylloxycarbonyl-glycinester)-3'-O-tert-butyltrimethylsilyl-2'-desoxythymidin (13)



Das Glycethymidin **12** (180 mg, 0.505 mmol) wurde in abs. Dioxan (2 mL) gelöst und mit Triethylamin (0.42 mL, 3.0 mmol), Boc-Glycin (442 mg, 2.52 mmol), DCC (521 mg,

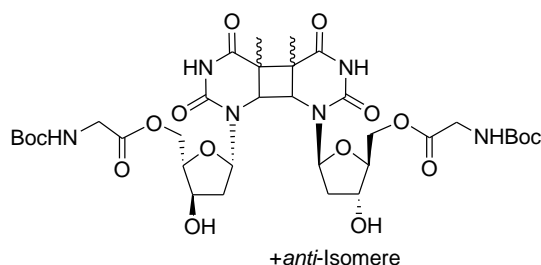
2.52 mmol) und DMAP (4.9 mg (0.04 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, das Filtrat eingengt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc; 6:4) und mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex G10 (Eluent: EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 140 mg (0.175 mmol, M = 799.98 g/mol), 35 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 6:4): 0.36;

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.13 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.19 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 7.0 Hz, ³J_{1',2'b} = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 4.97 (s, 1H, H-1_{Man}), 4.29 (dd, ³J_{4',5'a} = 4.9 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 12.0 Hz, 1H, H-5'a), 4.25-4.20 (m, 2H, H-5'b, H-3'), 4.01-3.97 (m, 3H, H-4', OCH_{2a}, H-3_{Man}), 3.93 (d, ³J_{2,3} = 5.2 Hz, 1H, H-2_{Man}), 3.88-3.82 (m, 2H, N³CH₂), 3.79 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 5.8 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2b} = 7.7 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.4 Hz, 1H, OCH_{2b}), 3.73 (dd, ³J_{5,6a} = 5.7 Hz, ²J_{6a,6b} = 10.8 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.66-3.56 (m, 2H, H-4_{Man}, H-6b_{Man}), 3.38 (ddd, ³J_{5,6a} = 5.5 Hz, ³J_{5,6b} = 10.3 Hz, ³J_{4,5} = 10.3 Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.23 (ddd, ³J_{2',3'} = 3.5 Hz, ³J_{1',2'} = 6.2 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.6 Hz, 1H, H-2'a), 2.02 (ddd, ³J_{1',2'} = 6.8 Hz, ³J_{2',3'} = 6.8 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.6 Hz, 1H, H-2'b), 1.88 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.54 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.45 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.41 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.32 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.26 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 0.81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.01 (s, 6H, Si(CH₃)₂) ppm.

5'-O-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-glycinester)-2'-desoxythymidin-Dimer (14)



Der Ester **9** (20 mg, 0.05 mmol) wurde in Wasser (1.5 mL) gelöst und mit Aceton (1.5 mL) als Triplettensensitizer versetzt. Die Lösung wurde 30 min. im Stickstoffstrom entgast und anschließend mit einer Hg-Mitteldrucklampe bei λ > 295 nm 6 h belichtet. Das Lösungsmittel

wurde *in vacuo* entfernt und das Isomerengemisch mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: H₂O) vom Edukt getrennt.

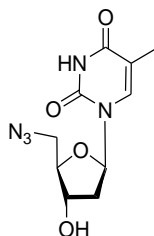
Ausbeute: 18.7 mg (0.023 mmol, M = 798.33 g/mol), 93 %.

R_f-Wert (EtOAc : MeOH; 8:2): 0.65;

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 6.34 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 5.9 Hz, ³J_{1',2'b} = 5.9 Hz, 1H, H-1'), 6.32 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 5.9 Hz, ³J_{1',2'b} = 5.9 Hz, 1H, H-1'), 6.08-5.98 (m, 2H, H-1'), 5.91 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.6 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.80 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.8 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 4.56 (m_c, 12H, H-6), 4.42-3.76 (m), 2.22-2.05 (m, H-2'), 1.46-1.42 (m, CH₃Thy, C(CH₃)₃) ppm.

MALDI-ToF-MS: ber.: *m/z* 821.32 [M + Na]⁺; gef.: *m/z* 821.49 [M + Na]⁺.

5'-Azido-5',2'-dideoxythymidin (17)^[111]



2'-Desoxythymidin (**5**, 330 mg, 1.36 mmol) wurde nacheinander mit Pyridin und Toluol codestilliert. Der Rückstand wurde in Dimethylformamid (5 mL) aufgenommen und mit Triphenylphosphin (356 mg, 1.36 mmol), Natriumazid (442 mg, 6.80 mmol) und Tetrabrommethan (452 mg, 1.36 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt, mit Methanol (5 mL) versetzt und 1 h weiter gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂ : EtOH, 98 : 2 → 90 : 10) wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 281 mg (1.05 mmol, M = 267.24 g/mol), 77 %

R_f-Wert (CH₂Cl₂ : EtOH, 98 : 2): 0.12;

Schmp.: 149 °C;

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 7.55 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.25 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 7.0 Hz, ³J_{1',2'b} = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 4.35 (ddd, ³J_{2'b,3'} = 4.4 Hz, ³J_{3',4'} = 4.4 Hz, ³J_{2'a,3'} = 6.4 Hz, 1H, H-3'), 3.96 (ddd, ³J_{3',4'} = 3.8 Hz, ³J_{4',5'a} = 3.8 Hz, ³J_{4',5'b} = 5.1 Hz, 1H, H-4'), 3.60 (dd, ³J_{4',5'a} = 3.7 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 13.2 Hz, 1H, H-5'a), 3.55 (dd, ³J_{4',5'b} = 5.0 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 13.3 Hz, 1H, H-5'b), 2.32 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 6.3 Hz, ³J_{1',2'a} = 7.1 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.8 Hz, 1H, H-2'a), 2.25 (ddd, ³J_{1',2'b} = 6.6 Hz, ³J_{2'b,3'} = 4.4 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.8 Hz, 1H, H-2'b), 1.90 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 3H, CH₃_{Thy}) ppm;

¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ = 166.2 (C4_{Thy}), 152.1 (C2_{Thy}), 137.7 (C6_{Thy}), 111.9 (C5_{Thy}), 86.2 (C4', C1'), 72.8 (C3'), 53.8 (C5'), 40.0 (C2'), 12.2 (CH₃_{Thy}) ppm;

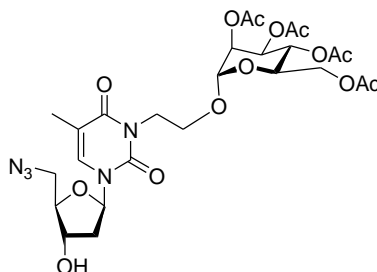
ESI-MS: ber.: *m/z* 290.087 [M + Na]⁺; gef.: *m/z* 290.093 [M + Na]⁺;

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3388, 3184, 2924, 2099, 1720, 1654 cm⁻¹;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +91.3^\circ$ (c = 6.0 mg/mL, MeOH);

EA C₁₀H₁₃N₅O₄ (M = 267.24 g/mol): ber.: C 44.94, H 4.90, N 26.21; gef.: C 44.90, H 4.94, N 25.18.

N³-(2-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-azido-5',2'-dideoxythymidin (19)^[97]



Unter N₂-Atmosphäre wurde 5'-Azido-2',5'-dideoxythymidin (**17**, 150 mg, 0.561 mmol) in abs. Dimethylformamid (3 mL) gelöst, mit Acetyl-geschütztem Bromethylmannosid (**18**, 255 mg, 0.561 mmol), DBU (84 μ L, 0.561 mmol) und TBAI (207 mg, 0.561 mmol) versetzt

und 42 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in Dichlormethan (10 mL) aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (EE) gereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 245 mg (0.396 mmol, M = 641.58 g/mol), 71 %.

R_f-Wert (EE): 0.24;

Schmp.: 50 °C;

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 7.38 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.21 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.4 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 5.25 (dd~t, ³J_{3,4} = 9.8 Hz, ³J_{4,5} = 9.8 Hz, 1H, H-4_{Man}), 5.21 (dd, ³J_{2,3} = 3.1 Hz, ³J_{3,4} = 9.3 Hz, 1H, H-3_{Man}), 5.19 (dd, ³J_{1,2} = 1.7 Hz, ³J_{2,3} = 3.1 Hz, 1H, H-2_{Man}), 4.94 (d, ³J_{1,2} = 1.5 Hz, 1H, H-1_{Man}), 4.44 (ddd~dt, ³J_{2'a,3'} = 4.5 Hz, ³J_{3',4'} = 4.5 Hz, ³J_{2'b,3'} = 6.7 Hz, 1H, H-3'), 4.33 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 5.2 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 8.3 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.5 Hz, 1H, N³CH₂a), 4.26 (dd, ³J_{5,6a} = 5.3 Hz, ²J_{6a,6b} = 12.3 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 4.11 (ddd~dt, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 4.7 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2b} = 4.7 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 12.7 Hz, 1H, N³CH₂b), 4.09 (dd, ³J_{5,6b} = 2.3 Hz, ²J_{6a,6b} = 12.2 Hz, 1H, H-6b_{Man}), 4.05 (ddd~q, ³J_{3',4'} = 4.0 Hz, ³J_{4',5'a} = 4.0 Hz, ³J_{4',5'b} = 4.0 Hz, 1H, H-4'), 3.95 (ddd, ³J_{5,6b} = 2.3 Hz, ³J_{5,6a} = 5.3 Hz, ³J_{4,5} = 8.7 Hz, 1H, H-5_{Man}), 3.88 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 5.0 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 8.4 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.9 Hz, 1H, OCH₂a), 3.76 (ddd~dt, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 4.8 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 4.8 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.7 Hz, 1H, OCH₂b), 3.74 (dd, ³J_{4',5'a} = 3.6 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 13.3 Hz, 1H, H-5'a), 3.59 (dd, ³J_{4',5'b} = 4.0 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 13.2 Hz, 1H, H-5'b), 2.43 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 4.5 Hz, ³J_{1',2'a} = 6.3 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.9 Hz, 1H, H-2'a), 2.27 (ddd, ³J_{1',2'b} = 6.7 Hz, ³J_{2'b,3'} = 6.7 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.6 Hz, 1H, H-2'b), 2.15 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.11 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.97 (s, 3H, CH₃Thy) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ = 170.7 (C(O)CH₃), 170.2 (C(O)CH₃), 170.1 (C(O)CH₃), 169.7 (C(O)CH₃), 163.2 (C₄Thy), 150.9 (C₂Thy), 133.8 (C₆Thy), 110.2 (C₅Thy), 96.6 (C₁Man), 86.0 (C_{1'}), 84.4 (C_{4'}), 71.4 (C_{3'}), 69.4 (C₃Man), 69.4 (C₂Man), 68.7 (C₅Man), 66.1 (C₄Man),

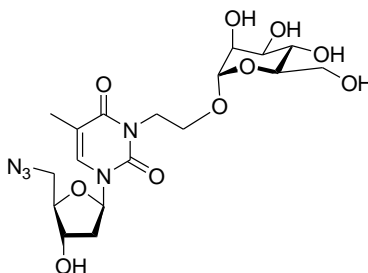
63.5 (OCH₂), 62.4 (C₆_{Man}), 52.2 (C5'), 40.7 (C2'), 39.3 (N³CH₂), 20.9 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃), 13.2 (CH₃_{Thy}) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 664.208 [M+Na]⁺; gef.: m/z 664.195 [M+Na]⁺;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +95.3$ (c = 4.2 mg/mL, DCM);

EA C₂₆H₃₅N₅O₁₄ (M = 641.58 g/mol): ber.: C 48.67, H 5.50, N 10.92; gef.: C 50.41, H 5.74, N 11.30.

N³-(2-(α -D-Mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-azido-5',2'-dideoxythymidin (20)^[97]



Das Zucker-modifizierte Thymidin-Derivat (**19**, 90 mg, 0.14 mmol) wurde in Methanol (1 mL) gelöst und mit Natriummethanolat (10 mg) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit saurem Ionentauscher wurde filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Es wurde ein farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 66.4 mg (0.140 mmol, M = 473.43 g/mol), quant.

R_f-Wert (EE : MeOH, 9 : 1): 0.23;

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 7.61 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.32 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.7 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 4.82 (d, ³J_{1,2} = 1.7 Hz, 1H, H-1_{Man}), 4.38 (ddd~dt, ³J_{3',4'} = 3.8 Hz, ³J_{2'a,3'} = 5.2 Hz, ³J_{2'b,3'} = 5.2 Hz, 1H, H-3'), 4.35 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 5.3 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 7.8 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.4 Hz, 1H, N³CH₂a), 4.10 (ddd~dt, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 5.0 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2b} = 5.0 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.3 Hz, 1H, N³CH₂b), 4.01 (ddd~dt, ³J_{3',4'} = 3.8 Hz, ³J_{4',5'a} = 3.8 Hz, ³J_{4',5'b} = 5.1 Hz, 1H, H-4'), 3.93 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 5.3 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 8.0 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.6 Hz, 1H, OCH₂a), 3.80 (dd, ³J_{5,6a} = 2.5 Hz, ²J_{6a,6b} = 11.7 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.76 (dd, ³J_{1,2} = 1.7 Hz, ³J_{2,3} = 2.9 Hz, 1H,

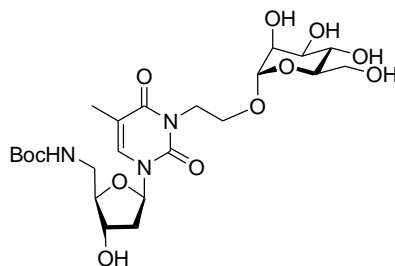
H-2_{Man}), 3.74 (ddd, $^3J_{\text{NCH2a,OCH2b}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{NCH2b,OCH2b}} = 5.2$ Hz, $^2J_{\text{OCH2a,OCH2b}} = 10.3$ Hz, 1H, OCH₂b), 3.71 (dd, $^3J_{5,6} = 5.6$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 11.7$ Hz, 1H, H-6b_{Man}), 3.69 (dd, $^3J_{4',5'a} = 3.7$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 13.3$ Hz, 1H, H-5'a), 3.63 (m, 3H, H-5'b, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 3.40 (ddd, $^3J_{5,6a} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,6b} = 5.7$ Hz, $^3J_{4,5} = 9.6$ Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.35 (dd, $^3J_{2',3'} = 5.3$ Hz, $^3J_{1',2'} = 6.7$ Hz, 2H, H-2'), 1.97 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.2$ Hz, 3H, CH₃_{Thy}) ppm;

¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz): $\delta = 165.3$ (C4_{Thy}), 152.4 (C2_{Thy}), 136.2 (C6_{Thy}), 111.0 (C5_{Thy}), 101.0 (C1_{Man}), 87.4 (C1'), 86.5 (C4'), 74.8 (C5_{Man}), 72.6 (C4_{Man}), 72.5 (C3'), 72.1 (C2_{Man}), 68.5 (C3_{Man}), 64.4 (OCH₂), 62.8 (C6_{Man}), 53.4 (C5'), 41.3 (N³CH₂), 40.5 (C2'), 13.2 (CH₃_{Thy}) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 496.166 [M+Na]⁺; gef.: m/z 496.175 [M+Na]⁺;

EA C₁₈H₂₇N₅O₁₀ (M = 473.43 g/mol): ber.: C 45.66, H 5.75, N 14.79; gef.: C 42.48, H 5.91, N 12.35.

5'-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylamino)-*N*³-[2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]-2',5'-dideoxythymidin (21)^[97]



Das Azid **20** (15.0 mg, 31.7 μ mol) wurde in Methanol (2 mL) gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle (3 mg) und Boc₂O (35.0 mg, 0.160 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h unter H₂-Atmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde über einen Spritzenfilter (Porengröße: 0.45 μ m) filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc / MeOH, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 14.4 mg (26.3 μ mol, M = 547.55 g/mol); 83 %

R_f-Wert (EtOAc : MeOH, 3:1): 0.33;

Schmp.: 104 °C;

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 7.59 (m_c, 1H, H-6_{Thy}), 6.23 (dd, ³J_{1',2'a} = 6.4 Hz, ³J_{1',2'b} = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 4.78 (d, ³J_{1,2} = 1.5 Hz, 1H, H-1_{Man}), 4.32 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 5.4 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 8.0 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.4 Hz, 1H, N³CH_{2a}), 4.26 (ddd~dt, ³J_{3',4'} = 3.1 Hz, ³J_{2'a,3'} = 3.1 Hz, ³J_{2'b,3'} = 6.1 Hz, 1H, H-3'), 4.05 (ddd~dt, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 4.9 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2b} = 4.9 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.4 Hz, 1H, N³CH_{2b}), 3.91-3.86 (m, 1H, H-4'), 3.89 (ddd, ³J_{OCH2a,NCH2b} = 5.2 Hz, ³J_{OCH2a,NCH2a} = 8.0 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.4 Hz, 1H, OCH_{2a}), 3.75 (dd, ³J_{5,6a} = 2.5 Hz, ²J_{6a,6b} = 11.8 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.73 (m_c, 1H, H-2_{Man}), 3.70 (ddd~dt, ³J_{OCH2b,NCH2a} = 5.0 Hz, ³J_{OCH2b,NCH2b} = 5.0 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.1 Hz, 1H, OCH_{2b}), 3.68 (dd, ³J_{5,6b} = 5.5 Hz, ²J_{6a,6b} = 11.8 Hz, 1H, H-6b_{Man}), 3.60 (m_c, 2H, H-4_{Man}, H-3_{Man}), 3.37-3.30 (m, 3H, H-5_{Man}, 2x H-5'), 2.31 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 3.5 Hz, ³J_{1',2'a} = 6.1 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.8 Hz, 1H, H-2'a), 2.31 (ddd, ³J_{1',2'b} = 6.8 Hz, ³J_{2'b,3'} = 6.8 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.7 Hz, 1H, H-2'b), 1.95 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ = 165.4 (C4_{Thy}), 158.7 (NHC(O)), 152.4 (C2_{Thy}), 136.5 (C6_{Thy}), 110.9 (C5_{Thy}), 100.9 (C1_{Man}), 87.5 (C1'), 87.2 (C4'), 80.4 (C(CH₃)₃), 74.8 (C5_{Man}), 72.9 (C4_{Man}), 72.5 (C3'), 72.0 (C2_{Man}), 68.4 (C3_{Man}), 64.4 (OCH₂), 62.8 (C6_{Man}), 43.5 (C5'), 41.2 (N³CH₂), 40.5 (C2'), 28.8 (C(CH₃)₃), 13.3 (CH₃_{Thy}) ppm;

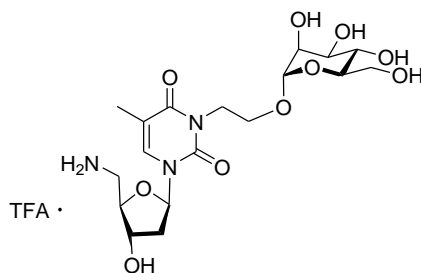
ESI-MS: ber.: m/z 570.227 [M+Na]⁺; gef.: m/z 570.222 [M+Na]⁺;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu}$ = 3359, 2930, 1693, 1661, 1628, 1525, 1469, 1366, 1251, 1165, 1132, 1051, 1024, 974, 769 cm⁻¹;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +67.2^\circ$ (c = 1.9, MeOH);

EA C₂₃H₃₇N₃O₁₂ · ½ H₂O (M = 547.5528 g/mol): ber.: C 49.63, H 6.88, N 7.55; gef.: C 49.83, H 7.21, N 7.27.

5'-Amino-N³-[2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]-2',5'-dideoxythymidin-trifluoroacetat (22)^[97]



Boc-geschütztes Glycothymidin **21** (14 mg, 0.026 mmol) wurde in Dichlormethan (1 mL) gelöst und mit Trifluoressigsäure (0.3 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde ohne Hitze *in vacuo* entfernt.

Ausbeute: 14 mg (26 μ mol, M = 544.45 g/mol); quant.

Schmp.: 70 °C;

¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 7.33 (m_c, 1H, H-6_{Thy}), 6.05 (dd~t, ³J_{1',2'} = 7.0 Hz, 1H, H-1'), 4.72-4.78 (m, 1H, H-1_{Man}), 4.30 (ddd~dt, ³J_{2',b,3'} = 4.8 Hz, ³J_{3',4'} = 4.8 Hz, ³J_{2',a,3'} = 7.5 Hz, 1H, H-3'), 4.18 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 4.5 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 8.8 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.9 Hz, 1H, N³CH_{2a}), 3.96 (ddd, ³J_{4',5',a} = 3.4 Hz, ³J_{3',4'} = 4.9 Hz, ³J_{4',5',b} = 9.8 Hz, 1H, H-4'), 3.91 (ddd~dt, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 4.2 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2b} = 4.2 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 14.2 Hz, 1H, N³CH_{2b}), 3.75 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 4.1 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 8.8 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.7 Hz, 1H, OCH_{2a}), 3.69 (dd~t, ³J_{1,2} = 1.9 Hz, ³J_{2,3} = 1.9 Hz, 1H, H-2_{Man}), 3.63 (ddd~dt, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 4.5 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2b} = 4.5 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.7 Hz, 1H, OCH_{2a}), 3.59 (dd, ³J_{5,6a} = 2.4 Hz, ²J_{6a,6b} = 12.2 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.53 (dd, ³J_{5,6b} = 6.1 Hz, ²J_{6a,6b} = 12.2 Hz, 1H, H-6b_{Man}), 3.48-3.43 (m, 2H, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 3.28 (dd, ³J_{4',5',a} = 3.0 Hz, ²J_{5',a,5',b} = 13.7, 1H, H-5'a), 3.13 (m_c, 1H, H-5_{Man}), 3.09 (dd, ³J_{4',5',b} = 10.1 Hz, ²J_{5',a,5',b} = 13.6, 1H, H-5'b), 2.41 (ddd~dt, ³J_{1',2',a} = 7.1 Hz, ³J_{2',a,3'} = 7.1 Hz, ²J_{2',a,2',b} = 14.4 Hz, 1H, H-2'a), 2.25 (ddd, ³J_{2',b,3'} = 4.9 Hz, ³J_{1',2',b} = 7.4 Hz, ²J_{2',a,2',b} = 14.4 Hz, 1H, H-2'b), 1.77 (s, 3H, CH₃_{Thy}) ppm;

¹³C-NMR (D₂O, 125 MHz): δ = 165.4 (C₄_{Thy}), 162.9 (q, J = 91 Hz, C(O)CF₃), 151.5 (C₂_{Thy}), 137.0 (C₆_{Thy}), 116.3 (q, J = 292 Hz, C(O)CF₃), 110.5 (C₅_{Thy}), 99.1 (C₁_{Man}), 87.8 (C_{1'}), 81.6 (C_{4'}), 73.0 (C₅_{Man}), 71.4 (C_{3'}), 70.5 (C₄_{Man}), 69.9 (C₂_{Man}), 66.4 (C₃_{Man}), 63.6 (OCH₂), 60.7 (C₆_{Man}), 41.3 (C_{5'}), 40.4 (N³CH₂), 37.6 (C_{2'}), 12.1 (CH₃_{Thy}) ppm;

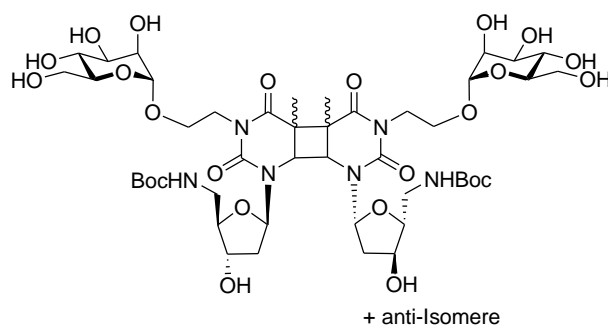
ESI-MS: ber.: m/z 448.193 $[M+H]^+$; gef.: m/z 496.193 $[M+H]^+$;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu}$ = 3377, 2934, 2100, 1667, 1632, 1471, 1180, 11130, 1049, 1027, 974, 770 cm^{-1} ;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = + 52.4$ ($c = 1.00$, MeOH);

EA $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$, TFA ($M = 544.4530$ g/mol): ber.: C 40.07, H 4.74, N 6.37; gef.: C 39.99, H 4.94, N 6.10.

5'-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylamino)-*N*³-[2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]-2',5'-dideoxythymidin-Dimer (23)



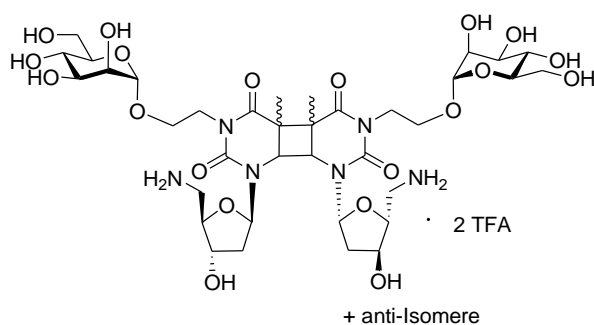
Zur Photodimerisierung wurde Glycothymidin (**21**, 20 mg, 0.04 mmol) in einer Quarzküvette in Wasser (1 mL) gelöst und mit Aceton (1 mL) als Triplettensensitizer versetzt. Die Lösung wurde 30 min. im Stickstoffstrom entgast. Anschließend wurde die Lösung 6 h mit Hilfe einer 150 W Quecksilber-Mitteldrucklampe bei einer Wellenlänge von $\lambda \geq 295$ nm belichtet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produktgemisch durch dreimalige Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: H_2O) gereinigt.

Ausbeute: 7.2 mg (6.6 μmol , $M = 1096.11$ g/mol); 36%

¹H-NMR (D_2O , 600 MHz): $\delta = 6.16$ (dd, $^3J_{1',2'a} = 5.9$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 8.6$ Hz, 1H, H-1'), 6.02 (dd~t, $^3J_{1',2'a} = 6.8$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'), 5.88 (dd~t, $^3J_{1',2'a} = 6.9$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 6.9$ Hz, 1H, H-1'), 5.67 (m, 1H, H-1'), 5.56 (dd~t, $^3J_{1',2'a} = 6.8$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'), 5.37 (dd~t, $^3J_{1',2'a} = 6.3$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 6.3$ Hz, 1H, H-1'), 4.82-4.68 (m, H-1_{Man}, H-6_{Thy}), 4.31-3.07 (m), 2.47-2.02 (m, H-2'), 1.50-1.16 (m, CH_3 _{Thy}, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

MALDI-ToF-MS: ber.: m/z 1117.47 $[M+Na]^+$; gef.: m/z 1117.41 $[M+Na]^+$.

5'-Amino- N^3 -[2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl]-2',5'-dideoxythymidin-trifluoroacetat-Dimer (24)



Das Dimer **23** (22 mg, 0.02 mmol) wurde in Dichlormethan (1 mL) gelöst und mit Trifluoressigsäure (0.3 mL) versetzt. Die Lösung wurde 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde ohne Hitze *in vacuo* entfernt. Es wurde ein farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 22 mg (0.02 mmol, $M = 1088.91$ g/mol); quant.

Alternative Synthese:

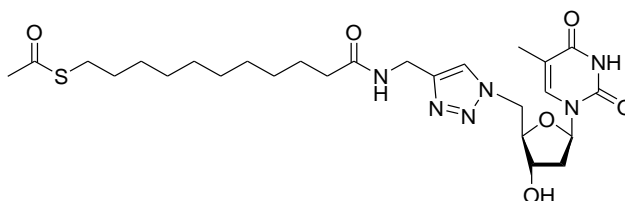
Zur Photodimerisierung wurde Glycothymidin **22** (20 mg, 0.04 mmol) in einer Quarzküvette in Wasser (1 mL) gelöst und mit Aceton (1 mL) als Triplettensensitizer versetzt. Die Lösung wurde 30 min. im Stickstoffstrom entgast. Anschließend wurde die Lösung 6 h mit Hilfe einer 150 W Quecksilber-Mitteldrucklampe bei einer Wellenlänge von $\lambda \geq 295$ nm belichtet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produktgemisch durch Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: H_2O) gereinigt.

Ausbeute: 17.6 mg (0.016 mmol, $M = 1088.91$ g/mol); 80 %.

1H -NMR (D_2O , 500 MHz): $\delta = 6.07$ (m, H-1'), 5.93 (t, $^3J = 7.1$ Hz, H-1'), 5.85 (m_c, H-1'), 5.59 (t, $^3J = 7.0$ Hz, H-1'), 5.47 (m_c, H-1'), 4.80-4.70 (m, H-1_{Man}), 4.36-4.12 (m, H-3', N³CH₂a), 4.04-3.35 (m, N³CH₂b, 2 x OCH₂, H-4', 2 x H-6_{Man}, H-2_{Man}, H-3_{Man}, H-4_{Man}, H-5_{Man}), 3.33-2.96 (m, 2 x H-5'), 2.59-2.03 (m, 2 x H-2'), 1.86-1.25 (m, CH₃Thy) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 917.360 $[M+Na]^+$; gef.: m/z 917.340 $[M+Na]^+$.

1-(2',5'-Didesoxythymidin-5'-yl)-4-(11-acetylthio-undecansäuremethylamid)-1H-1,2,3-triazol (26)



Zur Vorbereitung der „Click-Reaktion“ wurde abs. Dimethylformamid (20 mL) 30 min. im Ultraschallbad entgast. Azidothymidin (**17**, 225 mg, 0.840 mmol), Alkin (**25**, 300 mg, 1.01 mmol) und Kupferiodid (32 mg, 0.17 mmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre in dem entgasten abs. Dimethylformamid gelöst und 15 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Spritzenfilter (Porengröße: 0.45 µm) filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM : MeOH, 10:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 352 mg (0.623 mmol, M = 564.70 g/mol); 74%.

R_f-Wert (DCM : MeOH, 10:1): 0.23;

Schmp.: 193 °C;

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 11.31 (s, 1H, NH_{Thy}), 8.25 (t, ³J_{CH₂,NH} = 5.7 Hz, 1H, C(O)NH), 7.87 (s, 1H, CH_{Triazol}), 7.37 (q, ⁴J_{CH₃,6} = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.18 (dd, ³J_{1',2'a} = 6.4 Hz, ³J_{1',2'b} = 7.7 Hz, 1H, H-1'), 4.69 (dd, ³J_{4',5'a} = 4.4 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 14.3 Hz, 1H, H-5'a), 4.59 (dd, ³J_{4',5'b} = 7.6 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 14.3 Hz, 1H, H-5'b), 4.29-4.25 (m, 3H, H-3', C(O)NHCH₂), 4.07 (ddd, ³J_{3',4'} = 4.2 Hz, ³J_{4',5'a} = 4.2 Hz, ³J_{4',5'b} = 7.7 Hz, 1H, H-4'), 2.82 (t, ³J_{SCH₂CH₂,SCH₂} = 7.3 Hz, 2H, SCH₂), 2.32 (s, 3H, CH₃C(O)), 2.17 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 6.4 Hz, ³J_{1',2'a} = 7.7 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.7 Hz, 1H, H-2'a), 2.10 (ddd, ³J_{1',2'b} = 3.6 Hz, ³J_{2'b,3'} = 6.4 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.6 Hz, 1H, H-2'b), 2.07-2.04 (m, 2H, CH₂C(O)NH), 1.81 (d, ⁴J_{6,CH₃} = 1.2 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.52-1.47 (m, 4H, SCH₂CH₂, CH₂CH₂C(O)NH), 1.31-1.23 (m, 12H, S(CH₂)₂(CH₂)₆) ppm;

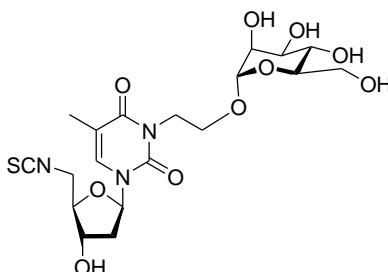
^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 195.8 ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$), 172.6 ($\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 164.1 ($\text{C}4_{\text{Thy}}$), 150.9 ($\text{C}2_{\text{Thy}}$), 145.6 ($\text{C}_{\text{q,Triazol}}$), 136.5 ($\text{C}6_{\text{Thy}}$), 123.9 ($\text{CH}_{\text{Triazol}}$), 110.3 ($\text{C}5_{\text{Thy}}$), 84.5 ($\text{C}4'$, $\text{C}1'$), 71.2 ($\text{C}3'$), 51.6 ($\text{C}5'$), 38.4 ($\text{C}2'$), 35.7 ($\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 34.5 ($\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2$), 31.0 ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$), 29.6 ($\text{S}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$), 29.3 (SCH_2CH_2), 29.2 ($\text{S}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$), 29.1 ($\text{S}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$), 28.9 ($\text{S}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$), 28.8 (SCH_2), 28.6 ($\text{S}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}$), 12.5 (CH_3_{Thy}) ppm;

MALDI-ToF-MS: ber.: m/z 565.28 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$; gef.: m/z 565.39 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu}$ = 3359, 3117, 2916, 2849, 1722, 1691, 1651, 1523, 1472, 1434, 1365, 1270, 1204, 1128, 1058, 1042, 1017, 981, 956, 904, 864, 789, 765, 752, 716, 633, 609, 553, 497, 470 cm^{-1} .

EA $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$ ($M = 564.70$ g/mol): ber.: C 55.30, H 7.14, N 14.88, S 5.68; gef.: C 54.82, H 7.07, N 14.56, S 4.80.

N^3 -[2-(α -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl]-5'-isothiocyanato-2',5'-dideoxythymidin (29**)**^[97]



Das Glycothymidin **20** (267 mg, 0.564 mmol) wurde in abs. Dioxan (10 mL) gelöst, Kohlenstoffdisulfid (700 μL , 11.3 mmol) und Ph_3P (163 mg, 0.620 mmol) wurden hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (EE / MeOH, 8:2) gereinigt. Es wurde ein farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 169 mg (0.345 mmol, $M = 489.50$ g/mol); 61 %;

R_f (EE / MeOH, 7:3): 0.30;

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): $\delta = 7.50$ (q, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.3$ Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.30 (dd~t, $^3J_{1',2'a} = 6.8$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 6.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.78 (d, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, 1H, H-1_{Man}), 4.37 (ddd~dt, $^3J_{2'a,3'} = 4.1$ Hz, $^3J_{3',4'} = 4.1$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 6.7$ Hz, 1H, H-3'), 4.31 (ddd, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{a}} = 7.9$ Hz, $^2J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{NCH}_2\text{b}} = 13.4$ Hz, 1H, N³CH₂a), 4.07 (ddd~dt, $^3J_{\text{NCH}_2\text{b},\text{OCH}_2\text{a}} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{b},\text{OCH}_2\text{b}} = 5.0$ Hz, $^2J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{NCH}_2\text{b}} = 13.4$ Hz, 1H, N³CH₂b), 4.00-3.95 (m, 2H, H-4', H-5'a), 3.90 (ddd, $^3J_{\text{NCH}_2\text{b},\text{OCH}_2\text{a}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{a}} = 7.9$ Hz, $^2J_{\text{OCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 10.4$ Hz, 1H, OCH₂a), 3.87 (dd, $^3J_{4',5'a} = 5.3$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 15.8$ Hz, 1H, H-5'b), 3.76 (dd, $^3J_{5,6\text{a}} = 2.5$ Hz, $^2J_{6\text{a},6\text{b}} = 11.8$ Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.73 (dd, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.0$ Hz, 1H, H-2_{Man}), 3.69 (ddd~dt, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 5.3$ Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{b},\text{OCH}_2\text{b}} = 5.3$ Hz, $^2J_{\text{OCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 10.5$ Hz, 1H, OCH₂b), 3.68 (dd, $^3J_{5,6\text{b}} = 5.5$ Hz, $^2J_{6\text{a},6\text{b}} = 11.8$ Hz, 1H, H-6b_{Man}), 3.61-3.58 (m, 2H, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 3.36 (ddd, $^3J_{5,6\text{a}} = 2.5$ Hz, $^3J_{5,6\text{b}} = 5.5$ Hz, $^3J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.36 (ddd, $^3J_{2'a,3'} = 4.2$ Hz, $^3J_{1',2'a} = 6.6$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.9$ Hz, 1H, H-2'a), 2.30 (ddd, $^3J_{2'b,3'} = 6.9$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 6.9$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.9$ Hz, 1H, H-2'b), 1.96 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.2$ Hz, 3H, CH₃Thy) ppm;

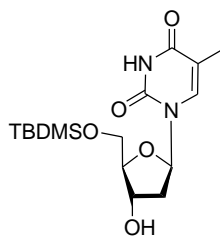
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 165.3$ (C4_{Thy}), 152.3 (C2_{Thy}), 135.9 (C6_{Thy}), 133.8 (NCS), 111.3 (C5_{Thy}), 101.0 (C1_{Man}), 87.2 (C1'), 85.3 (C4'), 74.6 (C5_{Man}), 72.5 (C3_{Man}), 72.3 (C3'), 72.0 (C2_{Man}), 68.4 (C4_{Man}), 64.4 (OCH₂), 62.8 (C6_{Man}), 47.5 (C5'), 41.3 (N³CH₂), 40.4 (C2'), 13.3 (CH₃Thy) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 512.131 [M+Na]⁺; gef.: m/z 512.135 [M+Na]⁺;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu} = 3346, 2926, 2099, 1697, 1626, 1467, 1334, 1267, 1130, 1052, 971, 884, 808, 768, 675, 554, 510, 484, 472, 460$ cm⁻¹;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +81.1$ (c = 6.25 mg/mL, MeOH);

EA C₁₉H₂₇N₃O₁₀S (M = 489.50g/mol): ber.: C 46.62, H 5.56, N 8.58, S 6.55; gef.: C 44.88, H 5.55, N 7.82, S 5.21.

5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin (41)

2'-Desoxythymidin (**5**, 1.00 g, 4.13 mmol) wurde in Pyridin (6 mL) gelöst und bei 0 °C mit TBDMS-Chlorid (685 mg, 4.54 mmol) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 4 h bei 0 °C gerührt. Es wurde weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von ges. NaHCO₃-Lösung (6 mL) wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EE : Cy, 9 : 1) gereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.08 g (3.02 mmol, M = 356.49 g/mol), 73%.

R_f-Wert (EE : MeOH, 8 : 2): 0.65;

Schmp.: 175 °C;

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 7.66 (q, ⁴J_{6,CH₃} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.31 (dd, ³J_{1',2'a} = 5.9 Hz, ³J_{1',2'b} = 7.9 Hz, 1H, H-1'), 4.41 (ddd~dt, ³J_{2'a,3'} = 2.5 Hz, ³J_{3',4'} = 2.5 Hz, ³J_{2'b,3'} = 5.5 Hz, 1H, H-3'), 4.00 (ddd~q, ³J_{3',4'} = 2.9 Hz, ³J_{4',5'a} = 2.9 Hz, ³J_{4',5'b} = 2.9 Hz, 1H, H-4'), 3.95 (dd, ³J_{4',5'a} = 2.8 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 11.5 Hz, 1H, H-5'a), 3.88 (dd, ³J_{4',5'b} = 3.2 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 11.4 Hz, 1H, H-5'b), 2.31 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 2.7 Hz, ³J_{1',2'a} = 5.9 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.4 Hz, 1H, H-2'a), 2.18 (ddd, ³J_{2'b,3'} = 6.0 Hz, ³J_{1',2'b} = 8.0 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.8 Hz, 1H, H-2'b), 1.92 (d, ⁴J_{6,CH₃} = 1.2 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 0.98 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.18 (s, 3H, SiCH₃), 0.18 (s, 3H, SiCH₃) ppm;

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ = 166.4 (C2_{Thy}), 152.3 (C4_{Thy}), 137.5 (C6_{Thy}), 111.4 (C5_{Thy}), 88.9 (C4'), 86.4 (C1'), 72.7 (C3'), 64.7 (C5'), 41.5 (C2'), 26.5 (SiC(CH₃)₃), 19.3 (SiC(CH₃)₃), 12.7 (CH₃_{Thy}), -5,3 (Si(CH₃)₂) ppm;

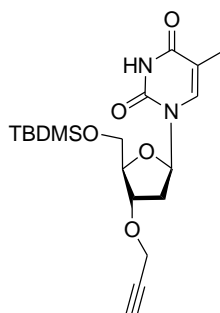
ESI-MS: ber.: *m/z* 379.167 [M+Na]⁺; gef.: *m/z* 379.168 [M+Na]⁺;

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2928, 2855, 1676, 1470, 1434, 1291, 1257, 1206, 1119, 1059, 1002, 941, 888, 830, 779, 708, 672, 643, 612, 556 cm^{-1} ;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +11.21^\circ$ (c = 4.3 mg/mL, MeOH);

EA $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ (M = 356.49 g/mol): ber.: C 53.91, H 7.92, N 7.86; gef.: C 54.07, H 7.96, N 7.98.

5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-propargyl-2'-desoxythymidin (**42**)



TBDMS-geschütztes Thymidin **41** (100 mg, 0.281 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in abs. Tetrahydrofuran (2 mL) gelöst, mit Natriumhydrid (17 mg, 0.70 mmol) versetzt und 20 min. mit Ultraschall behandelt. Nach Zugabe von Propargylbromid (53 μL , 0.70 mmol) wurde das Reaktionsgemisch für weitere 2 h im Ultraschallbad belassen. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc; 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 63 mg (0.16 mmol, M = 394.54 g/mol), 57%.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 3:7): 0.47;

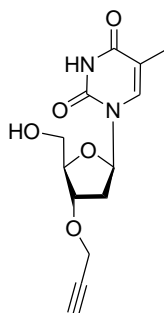
¹H-NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 8.31 (s, 1H, NH), 7.50 (q, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.2$ Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.28 (dd, $^3J_{1',2'a} = 5.6$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 8.6$ Hz, 1H, H-1'), 4.36 (ddd~dt, $^3J_{2'a,3'} = 1.9$ Hz, $^3J_{3',4'} = 1.9$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 6.9$ Hz, 1H, H-3'), 4.23 (dd, $^4J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}} = 2.4$ Hz, $^2J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 16.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{aC}\equiv\text{CH}$), 4.17 (dd, $^4J_{\text{CH}_2\text{b},\text{CH}} = 2.3$ Hz, $^2J_{\text{CH}_2\text{a},\text{CH}_2\text{b}} = 16.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{bC}\equiv\text{CH}$), 4.13 (m_c, 1H, H-4'), 3.91 (dd, $^3J_{4',5'a} = 2.6$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 11.3$ Hz, 1H, H-5'a), 3.82 (dd, $^3J_{4',5'b} = 2.4$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 11.4$ Hz, 1H, H-5'b), 2.45 (m_c, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.46 (ddd,

$^3J_{2'a,3'} = 1.8$ Hz, $^3J_{1',2'a} = 5.6$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.4$ Hz, 1H, H-2'a), 1.99 (ddd, $^3J_{2'b,3'} = 6.1$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 8.6$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.8$ Hz, 1H, H-2'b), 1.92 (d, $^4J_{6,CH_3} = 1.2$ Hz, 3H, CH₃Thy), 0.94 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.13 (s, 3H, SiCH₃), 0.13 (s, 3H, SiCH₃) ppm;

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): $\delta = 163.5$ (C₂Thy), 150.1 (C₄Thy), 135.3 (C₆Thy), 110.9 (C₅Thy), 85.0 (C_{4'}), 84.9 (C_{1'}), 79.1 (C≡CH), 78.6 (C_{3'}), 75.0 (C≡CH), 63.5 (C_{5'}), 56.4 (CH₂C≡CH), 37.7 (C_{2'}), 25.9 (SiC(CH₃)₃), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 12.5 (CH₃Thy), -5.4, -5.5 (Si(CH₃)₂) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 417.182 [M + Na]⁺; gef.: m/z 417.179 [M + Na]⁺;

3'-O-Propargyl-2'-desoxythymidin (43)



Das TBDMS-geschützte Thymidin-Derivat **42** (370 mg, 0.938 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in abs. Tetrahydrofuran gelöst, mit TBAF-Lösung (1M in Tetrahydrofuran; 1.8 mL) versetzt und über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc; 1:9) gereinigt.

Ausbeute: 246 mg (0.878 mmol, M = 280.28g/mol), 94%.

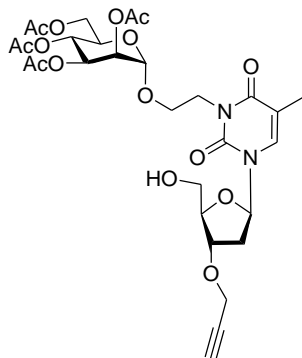
R_f-Wert (Cy : EtOAc; 3:7): 0.14;

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 7.80$ (q, $^4J_{6,CH_3} = 1.3$ Hz, 1H, H-6Thy), 6.22 (dd, $^3J_{1',2'a} = 5.9$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 8.3$ Hz, 1H, H-1'), 4.38 (ddd~dt, $^3J_{2'a,3'} = 2.5$ Hz, $^3J_{3',4'} = 2.5$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-3'), 4.27-4.20 (m, 2H, CH₂C≡CH), 4.06 (ddd~q, $^3J_{3',4'} = 3.4$ Hz, $^3J_{4',5'a} = 3.4$ Hz, $^3J_{4',5'b} = 3.4$ Hz, 1H, H-4'), 3.80 (dd, $^3J_{4',5'a} = 3.4$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 12.0$ Hz, 1H, H-5'a), 3.74 (dd, $^3J_{4',5'b} = 3.5$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 12.0$ Hz, 1H, H-5'b), 2.87 (mc, 1H, C≡CH), 2.40

(ddd, ${}^3J_{2'a,3'} = 2.4$ Hz, ${}^3J_{1',2'a} = 5.9$ Hz, ${}^2J_{2'a,2'b} = 13.7$ Hz, 1H, H-2'a), 2.20 (ddd, ${}^3J_{2'b,3'} = 6.2$ Hz, ${}^3J_{1',2'b} = 8.3$ Hz, ${}^2J_{2'a,2'b} = 14.0$ Hz, 1H, H-2'b), 1.88 (d, ${}^4J_{6,CH_3} = 1.3$ Hz, 3H, CH_{3Thy}) ppm;

${}^{13}C$ -NMR (CD₃OD, 125 MHz): $\delta = 166.4$ (C2_{Thy}), 152.4 (C4_{Thy}), 138.1 (C6_{Thy}), 111.7 (C5_{Thy}), 86.6 (C4'), 86.4 (C1'), 80.5 (C≡CH), 80.1 (C3'), 76.1 (C≡CH), 63.1 (C5'), 57.4 (CH₂C≡CH), 38.2 (C2'), 12.4 (CH₃Thy), ppm;

***N*³-(2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-3'-*O*-propargyl-2'-desoxythymidin (44)**



Das Alkin **43** (246 mg, 0.878 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in abs. Dimethylformamid (9 mL) gelöst und mit Bromoethylmannosid (**17**, 399 mg, 0.878 mmol), DBU (131 μ L, 0.878 mmol) und TBAI (342 mg, 0.878 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc, 2:8) gereinigt.

Ausbeute: 376 mg (0.574 mmol, M = 654.62 g/mol), 65%.

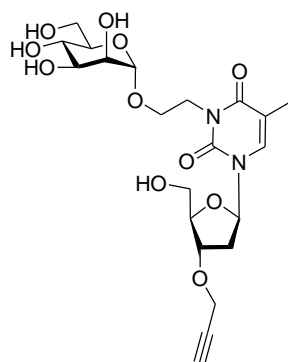
R_f-Wert (Cy : EtOAc; 1:9): 0.29;

1H -NMR (CDCl₃, 500 MHz) $\delta = 7.36$ (q, ${}^4J_{6,CH_3} = 1.3$ Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.09 (dd~t, ${}^3J_{1',2'a} = 6.4$ Hz, ${}^3J_{1',2'b} = 6.4$ Hz, 1H, H-1'), 5.26 (dd~t, ${}^3J_{3,4} = 9.9$ Hz, ${}^3J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1H,

H-4_{Man}), 5.23 (dd, $^3J_{2,3} = 3.5$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.8$ Hz, 1H, H-3_{Man}), 5.19 (dd, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.1$ Hz, 1H, H-2_{Man}), 4.92 (d, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H, H-1_{Man}), 4.42 (ddd~dt, $^3J_{2',a,3'} = 3.2$ Hz, $^3J_{3',4'} = 3.2$ Hz, $^3J_{2',b,3'} = 6.4$ Hz, 1H, H-3'), 4.31 (ddd, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{a}} = 7.8$ Hz, $^2J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{NCH}_2\text{b}} = 13.5$ Hz, 1H, N³CH₂a), 4.27 (dd, $^3J_{5,6\text{a}} = 5.2$ Hz, $^2J_{6\text{a},6\text{b}} = 12.3$ Hz, 1H, H-6a_{Man}), 4.26 (m_c, 1H, CH₂aC≡CH), 4.20 (m_c, CH₂bC≡CH), 4.15-4.11 (m, 2H, N³CH₂b, H-4'), 4.09 (dd, $^3J_{5,6\text{b}} = 2.4$ Hz, $^2J_{6\text{a},6\text{b}} = 12.2$ Hz, 1H, H-6b_{Man}), 3.98-3.95 (m, 1H, H-5_{Man}), 3.94 (dd, $^3J_{4',5'\text{a}} = 2.8$ Hz, $^2J_{5'\text{a},5'\text{b}} = 12.1$ Hz, 1H, H-5'a), 3.88 (ddd, $^3J_{\text{NCH}_2\text{b},\text{OCH}_2\text{a}} = 5.6$ Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{b},\text{OCH}_2\text{a}} = 7.7$ Hz, $^2J_{\text{OCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 10.7$ Hz, 1H, OCH₂a), 3.82 (dd, $^3J_{4',5'\text{b}} = 3.2$ Hz, $^2J_{5'\text{a},5'\text{b}} = 12.9$ Hz, 1H, H-5'b), 3.76 (ddd~dt, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 5.2$ Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 5.2$ Hz, $^2J_{\text{OCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}} = 10.6$ Hz, 1H, OCH₂b), 2.49 (ddd, $^3J_{2',a,3'} = 3.1$ Hz, $^3J_{1',2'\text{a}} = 6.4$ Hz, $^2J_{2'\text{a},2'\text{b}} = 14.0$ Hz, 1H, H-2'a), 2.47 (m_c, 1H, C≡CH), 2.38 (ddd, $^3J_{1',2'\text{b}} = 6.8$ Hz, $^3J_{2',b,3'} = 6.8$ Hz, $^2J_{2'\text{a},2'\text{b}} = 14.0$ Hz, 1H, H-2'b), 2.15 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.11 (s, 3H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.97 (s, 3H, C(O)CH₃), 1.95 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.3$ Hz, 3H, CH₃Thy) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ = 170.8 (C(O)CH₃), 169.9 (C(O)CH₃), 169.9 (C(O)CH₃), 169.8 (C(O)CH₃), 163.2 (C₄Thy), 150.9 (C₂Thy), 135.1 (C₆Thy), 110.3 (C₅Thy), 96.8 (C₁Man), 88.0 (C_{1'}), 85.0 (C_{4'}), 79.3 (C≡CH), 78.2 (C_{3'}), 75.0 (C≡CH), 69.3 (C₃Man), 69.2 (C₂Man), 68.7 (C₅Man), 66.0 (C₄Man), 63.4 (OCH₂), 62.6 (C₆Man), 62.4 (C_{5'}), 56.8 (CH₂C≡CH), 39.4 (C_{2'}), 36.9 (N³CH₂), 20.9 (C(O)CH₃), 20.8 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃), 20.7 (C(O)CH₃), 13.3 (CH₃Thy) ppm;

N³-(2-(α-D-Mannopyranosyloxy)ethyl)-3'-O-propargyl-2'-desoxythymidin (45)^[97]



Das Acetyl-geschützte Glycothymidin **44** (244 mg, 0.373 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in abs. Methanol gelöst (4 mL) und mit einer Spatelspitze

Natriummethanolat versetzt. Nach 3 h Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit Amberlite IR-120 neutralisiert. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

Ausbeute: 181 mg (0.372 mmol, M = 486.47 g/mol), quant.

R_f-Wert (EtOAc : MeOH; 8:2): 0.18;

Schmp.: 52-64°C;

¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ = 7.82 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.25 (dd, ³J_{1',2'a} = 5.9 Hz, ³J_{1',2'b} = 8.1 Hz, 1H, H-1'), 4.78 (d, ³J_{1,2} = 1.7 Hz, 1H, H-1_{Man}), 4.38 (ddd~dt, ³J_{3',4'} = 2.6 Hz, ³J_{2'a,3'} = 2.6 Hz, ³J_{2'b,3'} = 5.7 Hz, 1H, H-3'), 4.32 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 5.3 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 8.1 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.4 Hz, 1H, N³CH₂a), 4.24 (m_c, 2H, CH₂C≡CH), 4.08-4.03 (m, 2H, N³CH₂b, H-4'), 3.89 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 5.1 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 8.1 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.5 Hz, 1H, OCH₂a), 3.80 (dd, ³J_{5,6a} = 3.4 Hz, ²J_{6a,6b} = 12.0 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.76-3.66 (m, 5H, H-2_{Man}, OCH₂b, H-6b_{Man}, H-5'), 3.61-3.57 (m, 2H, H-4_{Man}, H-5_{Man}), 3.36-3.33 (m, 1H, H-3_{Man}), 2.89 (m_c, 1H, C≡CH), 2.45 (ddd, ³J_{1',2'b} = 2.5 Hz, ³J_{2'b,3'} = 5.9 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.9 Hz, 1H, H-2'a), 2.21 (ddd, ³J_{1',2'b} = 6.2 Hz, ³J_{2'b,3'} = 8.1 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 14.1 Hz, 1H, H-2'b), 1.92 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 3H, CH₃Thy) ppm;

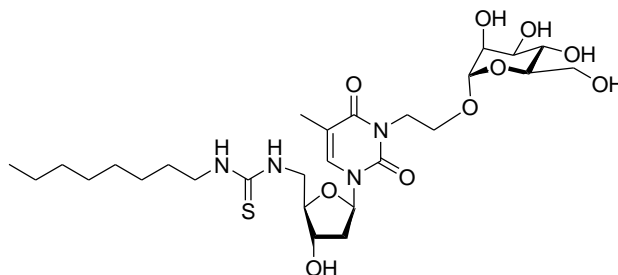
¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ = 165.4 (C₄Thy), 152.4 (C₂Thy), 136.6 (C₆Thy), 110.8 (C₅Thy), 100.9 (C₁Man), 87.4 (C_{1'}), 86.6 (C_{4'}), 80.5 (C≡CH), 80.0 (C_{3'}), 76.1 (C≡CH), 74.8 (C₃Man), 72.5 (C₂Man), 72.0 (C₅Man), 68.4 (C₄Man), 64.4 (OCH₂), 63.1 (C₆Man), 62.8 (C_{5'}), 57.4 (CH₂C≡CH), 41.2 (N³CH₂), 38.4 (C_{2'}), 13.2 (CH₃Thy) ppm;

MALDI-ToF-MS: ber.: *m/z* 509.175 [M+Na]⁺; gef.: 509.167 [M+Na]⁺;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu}$ = 3376, 2926, 2123, 1695, 1661, 1626, 1468, 1403, 1357, 1334, 1271, 1197, 1130, 1085, 1046, 972, 912, 856, 809, 769, 753, 676, 636, 552, 509, 482, 472 cm⁻¹;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = + 80.3^\circ$ (c = 8.1 mg/mL, MeOH);

EA C₂₁H₃₀N₂O₁₁ (M = 486.47 g/mol): ber.: C 51.85, H 6.22, N 5.76; gef.: C 47.47, H 6.37, N 5.33.

***N*³-[2-(α -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl]-5'-octylthioureido-2',5'-dideoxythymidin (52)**

Das Isothiocyanat **29** (80 mg, 0.16 mmol) wurde in abs. Dimethylformamid (2 mL) gelöst und mit Octylamin (41 μ L, 0.25 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc : MeOH; 5:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 74 mg (0.12 mmol, M = 618.74 g/mol); 73 %.

R_f-Wert (EtOAc : MeOH, 5:1): 0.52;

¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ = 7.53 (s, br, 1H, H-6_{Thy}), 6.22 (dd~t, ³*J*_{1',2'a} = 6.8 Hz, ³*J*_{1',2'b} = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 4.77 (d, ³*J*_{1,2} = 1.7 Hz, 1H, H-1_{Man}), 4.35-4.34 (m, 1H, H-3'), 4.32 (ddd, ³*J*_{NCH2a,OCH2b} = 5.3 Hz, ³*J*_{NCH2a,OCH2a} = 8.0 Hz, ²*J*_{NCH2a,NCH2b} = 13.4 Hz, 1H, N³CH_{2a}), 4.06 (ddd~dt, ³*J*_{NCH2b,OCH2} = 4.9 Hz, ³*J*_{NCH2b,OCH2} = 4.9 Hz, ²*J*_{NCH2a,NCH2b} = 13.4 Hz, 1H, N³CH_{2b}), 4.04-3.98 (m, 1H, H-4'), 3.89 (ddd, ³*J*_{NCH2b,OCH2a} = 5.1 Hz, ³*J*_{NCH2a,OCH2a} = 8.0 Hz, ²*J*_{OCH2a,OCH2b} = 10.5 Hz, 1H, OCH_{2a}), 3.75 (dd, ³*J*_{5,6a} = 2.5 Hz, ²*J*_{6a,6b} = 11.8 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.73-3.71 (m, 3H, H-2_{Man}, H-5'), 3.69 (ddd~dt, ³*J*_{NCH2a,OCH2b} = 5.0 Hz, ³*J*_{NCH2b,OCH2a} = 5.0 Hz, ²*J*_{OCH2a,OCH2b} = 10.3 Hz, OCH_{2b}), 3.67 (dd, ³*J*_{5,6b} = 5.4 Hz, ²*J*_{6a,6b} = 11.6 Hz, 1H, H-6b_{Man}), 3.62-3.58 (m, 2H, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 3.56-3.38 (br m, 2H, C(S)NHCH₂), 3.36-3.32 (m, 1H, H-5_{Man}), 2.31 (ddd, ³*J*_{2'a,3'} = 4.3 Hz, ³*J*_{1',2'a} = 6.5 Hz, ²*J*_{2'a,2'b} = 13.7 Hz, H-2'a), 2.31-2.26 (m, 1H, H-2'b), 1.94 (d, ⁴*J*_{6,CH3} = 1.2 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.58-1.53 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 1.34-1.27 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 0.90 (t, ³*J*_{CH3,CH2} = 7.0 Hz, 3H, (CH₂)₇CH₃) ppm;

¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ = 165.3 (C4_{Thy}), 152.4 (C2_{Thy}), 136.6 (C6_{Thy}), 111.0 (C5_{Thy}), 100.9 (C1_{Man}), 87.8 (C1'), 86.6 (C4'), 74.8 (C5_{Man}), 72.8 (C3'), 72.5 (C3_{Man}), 72.0 (C2_{Man}), 68.4 (C4_{Man}), 64.3 (OCH₂), 62.8 (C6_{Man}), 41.2 (N³CH₂), 40.2 (C2'), 33.0 (CH_{2,Alkyl}), 30.4 (CH_{2,Alkyl}), 30.4 (CH_{2,Alkyl}), 30.2 (CH_{2,Alkyl}), 28.0 (CH_{2,Alkyl}), 23.7 (CH_{2,Alkyl}), 14.4 (CH₂)₇CH₃ 13.2 (CH₃_{Thy}) ppm;

MALDI-ToF-MS: ber.: m/z 641.283 $[M+Na]^+$; gef.: m/z 641.344 $[M + Na]^+$;

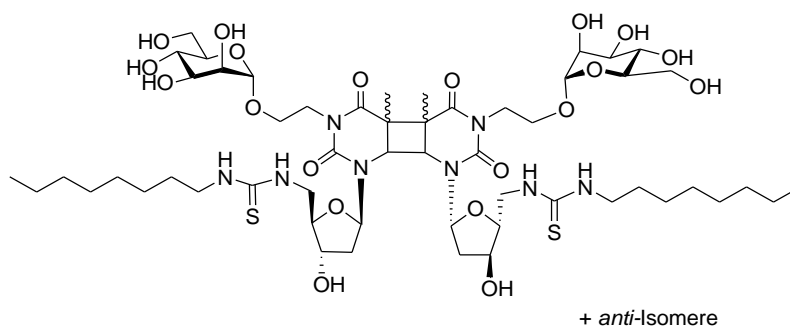
ESI-MS: ber.: m/z 641.283 $[M+Na]^+$; gef.: m/z 641.283 $[M + Na]^+$;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu}$ = 3306, 2924, 2855, 2356, 2107, 1696, 1626, 1555, 1467, 1338, 1268, 1131, 1051, 972, 913, 882, 852, 809, 768, 677, 575, 543, 516, 474 cm^{-1} ;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = + 61.2^\circ$ ($c = 15.2 \text{ mg/mL}$, MeOH);

EA $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$ ($M = 618.29 \text{ g/mol}$): ber.: C 52.41, H 7.49, N 9.05, S 5.18; gef.: C 50.08, H 7.41, N 8.64, S 4.1.

N^3 -[2-(α -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl]-5'-octylthioureido-2',5'-dideoxythymidin-Dimer (53)

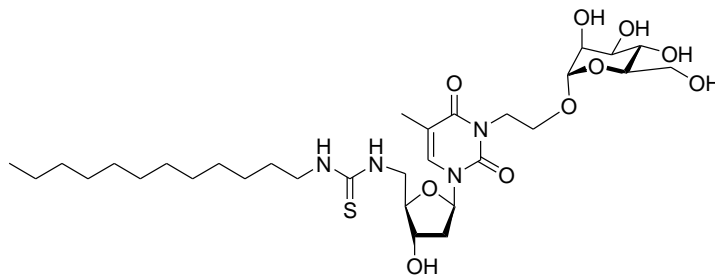


Das Glycothymidin **52** (26 mg, 0.042 mmol) wurde in einer Quarzküvette in Wasser (1.5 mL) gelöst und mit Aceton (1.5 mL) als Triplettensensitizer versetzt. Die Lösung wurde 30 min. im Stickstoffstrom entgast und 230 min. mit einer 150 W Hg-Mitteldrucklampe bei einer Wellenlänge von $\lambda \geq 295 \text{ nm}$ belichtet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Reaktionsgemisch wurde mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: H_2O) gereinigt.

Ausbeute: 19.6 mg (0.016 mmol, $M = 1237.48 \text{ g/mol}$); 75 %.

MALDI-ToF MS: ber.: m/z 1259.58 $[M+Na]^+$; gef.: m/z 1259.62 $[M+Na]^+$.

***N*³-[2-(α -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl]-5'-dodecylthioureido-2',5'-dideoxythymidin (55)**



Das Isothiocyanat **29** (100 mg, 0.204 mmol) wurde in abs. Dimethylformamid (3 mL) gelöst und mit Dodecylamin (56.8 mg, 0.306 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc : MeOH; 8:2) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 104 mg (0.155 mmol, 674.85 g/mol); 76 %.

R_f-Wert (EtOAc : MeOH, 7:3): 0.30;

Schmp.: 107 °C

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 7.57 (q, $^4J_{6,CH_3}$ = 1.1 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.26 (dd~t, $^3J_{1',2'a}$ = 6.8 Hz, $^3J_{1',2'b}$ = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 4.81 (d, $^3J_{1,2}$ = 1.5 Hz, 1H, H-1_{Man}), 4.40-4.35 (m, 1H, H-3'), 4.35 (ddd, $^3J_{NCH_2a,OCH_2b}$ = 5.4 Hz, $^3J_{NCH_2a,OCH_2a}$ = 7.9 Hz, $^2J_{NCH_2a,NCH_2b}$ = 13.3 Hz, 1H, N³CH₂a), 4.09 (ddd~dt, $^3J_{NCH_2b,OCH_2}$ = 4.8 Hz, $^3J_{NCH_2b,OCH_2}$ = 4.8 Hz, $^2J_{NCH_2a,NCH_2b}$ = 13.3 Hz, 1H, N³CH₂b), 4.07-4.01 (m, 1H, H-4'), 3.92 (ddd, $^3J_{NCH_2b,OCH_2a}$ = 5.1 Hz, $^3J_{NCH_2a,OCH_2a}$ = 7.9 Hz, $^2J_{OCH_2a,OCH_2b}$ = 10.4 Hz, 1H, OCH₂a), 3.78 (dd, $^3J_{5,6a}$ = 2.5 Hz, $^2J_{6a,6b}$ = 11.8 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.75 (dd, $^3J_{1,2}$ = 1.9 Hz, $^3J_{2,3}$ = 2.7 Hz, 1H, H-2_{Man}), 3.77-3.67 (m, 2H, H-5'), 3.69 (ddd~dt, $^3J_{NCH_2a,OCH_2b}$ = 5.0 Hz, $^3J_{NCH_2b,OCH_2a}$ = 5.0 Hz, $^2J_{OCH_2a,OCH_2b}$ = 10.3 Hz, OCH₂b), 3.67 (dd, $^3J_{5,6b}$ = 5.4 Hz, $^2J_{6a,6b}$ = 11.6 Hz, 1H, H-6b_{Man}), 3.66-3.61 (m, 2H, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 3.55-3.42 (br m, C(S)NHCH₂), 3.39-3.36 (m, 1H, H-5_{Man}), 2.37-2.28 (m, 2H, H-2'), 1.98 (d, $^4J_{6,CH_3}$ = 1.1 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.60-1.57 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 1.35-1.31 (m, 16H, ((CH₂)₈CH₃), 0.93 (t, $^3J_{CH_3,CH_2}$ = 6.9 Hz, 3H, ((CH₂)₁₁CH₃) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz): $\delta = 165.3$ (C4_{Thy}), 152.4 (C2_{Thy}), 136.6 (C6_{Thy}), 111.0 (C5_{Thy}), 101.0 (C1_{Man}), 87.8 ($\text{C1}'$), 86.6 ($\text{C4}'$), 74.7 (C5_{Man}), 72.8 ($\text{C3}'$), 72.5 (C3_{Man}), 72.0 (C2_{Man}), 68.4 (C4_{Man}), 64.4 (OCH_2), 62.8 (C6_{Man}), 41.2 (N^3CH_2), 40.2 ($\text{C2}'$), 33.1 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 30.8 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 30.7 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 30.7 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 30.7 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 30.5 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 30.2 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 28.0 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 23.7 ($\text{CH}_{2,\text{Alkyl}}$), 14.4 ($\text{CH}_2\text{-}_7\text{CH}_3$) 13.2 (CH_3_{Thy}) ppm;

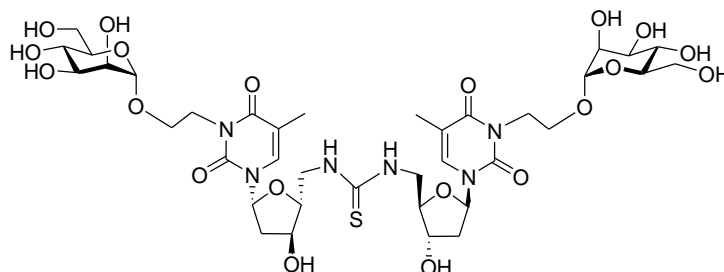
MALDI-ToF-MS: ber.: m/z 697.346 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; gef.: m/z 697.555 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu} = 3304, 2922, 2160, 1632, 1552, 1469, 1274, 1057, 768, 586 \text{ cm}^{-1}$;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = + 63.1^\circ$ ($c = 9.32 \text{ mg/mL}$, MeOH);

EA $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$ ($M = 674.85 \text{ g/mol}$): ber.: C 55.17, H 8.07, N 8.30, S 4.75; gef.: C 51.99, H 7.67, N 7.75, S 3.81.

***N*-{*N*³-[2-(α -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl]-2',5'-dideoxythymidin-5'-yl}-*N*'-[*N*³-[2-(α -D-mannopyranosyloxy)-ethyl]-2',5'-dideoxythymidin-5'-yl]-thioharnstoff (56)**



Das Amin **22** (22.2 mg, 0.041 mmol) wurde unter Stickstoff-Atmosphäre in abs. Dimethylformamid (4 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt, DIPEA (6.9 μL , 0.041 mmol) und Isothiocyanat **29** (20 mg, 0.041 mmol) wurden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: Wasser) gereinigt.

Ausbeute: 21 mg (0.022 mmol, $M = 936.93 \text{ g/mol}$), 55 %

Schmp.: 162 °C;

¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 7.41 (m, 2H, H-6_{Thy}), 6.06 (m, 2H, H-1'), 4.79 (d, ³J_{1,2} = 1.4 Hz, 2H, H-1_{Man}), 4.39 (m, 2H, H-3'), 4.24 (m, 2H, N³CH₂a), 4.06-3.93 (m, 4H, N³CH₂b, H-4'), 3.82 (m, 2H, OCH₂a), 3.78 (m, 2H, H-2_{Man}), 3.75-3.66 (m, 4H, H-5'a, OCH₂b), 3.70 (dd, ³J_{5,6a} = 2.4 Hz, ²J_{6a,6b} = 12.3 Hz, 2H, H-6a_{Man}), 3.65-3.62 (m, 2H, H-5'b), 3.63 (dd, ³J_{5,6b} = 5.8 Hz, ²J_{6a,6b} = 12.3 Hz, 2H, H-6b_{Man}), 3.59-3.54 (m, 5H, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 3.25-3.22 (m, 2H, H-5_{Man}), 2.38-2.30 (m, 4H, H-2'), 1.87 (m, 6H, CH₃_{Thy}) ppm;

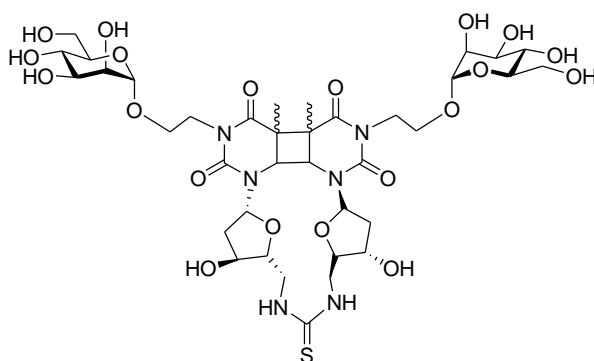
¹³C-NMR (D₂O, 125 MHz): δ = 165.2 (C4_{Thy}), 151.3 (C2_{Thy}), 136.1 (C6_{Thy}), 133.8 (NCS), 111.3 (C5_{Thy}), 99.0 (C1_{Man}), 86.4 (C1'), 84.4 (C4'), 73.0 (C5_{Man}), 71.0 (C3'), 70.6 (C3_{Man}), 70.0 (C2_{Man}), 66.4 (C4_{Man}), 63.5 (OCH₂), 60.7 (C6_{Man}), 59.3 (C5'), 40.4 (N³CH₂), 38.2 (C2'), 12.4 (CH₃_{Thy}) ppm;

MALDI-ToF-MS: ber.: m/z 959.317 [M + Na]⁺; gef.: m/z 959.614 [M + Na]⁺;

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3325, 2929, 1693, 1662, 1628, 1562, 1469, 1357, 1267, 1201, 1131, 1084, 1052, 1024, 975, 913, 882, 840, 806, 769, 675, 580, 512 cm⁻¹;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +65.8^\circ$ (c = 1.5 mg/mL, MeOH).

***N*-{*N*³-[2-(α -D-Mannopyranosyloxy)-ethyl]-2',5'-dideoxythymidin-5'-yl}-*N'*-{*N*³-[2-(α -D-mannopyranosyloxy)-ethyl]-2',5'-dideoxythymidin-5'-yl}-thioharnstoff-cyclobutan-dimer (57)**

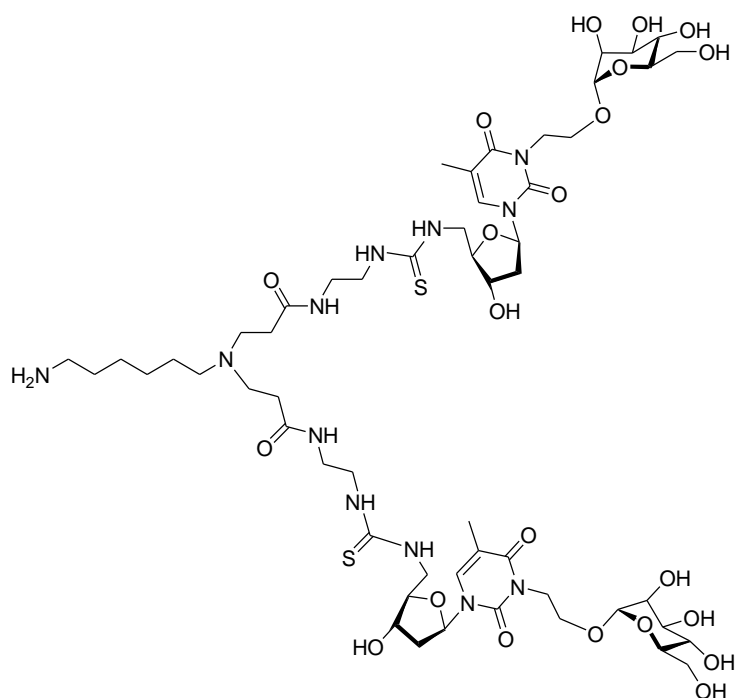


Thioharnstoff **45** (10.0 mg, 10.7 μ mol) wurde in Wasser (10 mL) gelöst und mit Aceton (10 mL) als Triplettensensitizer versetzt. Die Lösung wurde 30 min. im Stickstoffstrom entgast. Es wurde 3 h bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm mit einer Quecksilberlampe (150 W)

unter Benutzung eines Cut-Off-Filters belichtet. Das Produkt konnte nicht vom Edukt getrennt werden.

MALDI-ToF-MS: ber.: m/z 959.317 $[M + Na]^+$; gef.: m/z 959.526 $[M + Na]^+$.

***N*-([6-(*N,N*-Bis-2-[*N*³-[2-(α -D-mannopyranosyloxy)-ethyl]-2',5'-dideoxythymidin-5'-yl-thioureido)-ethyl)-aminocarbonyl]-ethyl)-aminoethyl)-amin (63)**



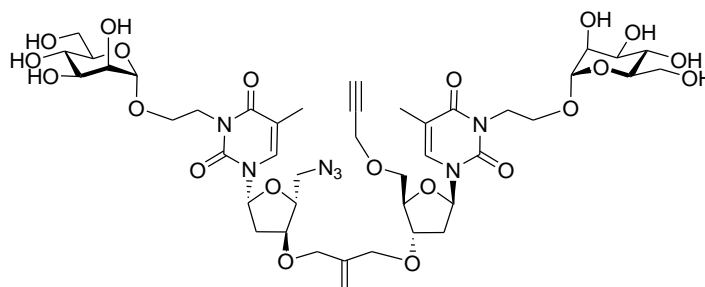
Das mit dem dendritischen Grundgerüst vorfunktionalisierte Gel **61** (100 mg, 0.048 mmol) wurde mit Isothiocyanat **27** (53.2 mg, 0.109 mmol) in abs. Dimethylformamid (2 mL) gelöst und DIPEA (7.8 μ L, 0.048 mmol) versetzt und 3 d bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Gel wurde mit Dimethylformamid (5 x 5 mL), Wasser (5 x 5 mL) und Dichlormethan (5 x 5 mL) gewaschen und über Nacht über Blaugel im Exsikkator getrocknet. Der Nachweis der Funktionalisierung erfolgte durch den Kaiser-Test^[212] (keine Blaufärbung!). Das Produkt wurde über Nacht durch Schütteln mit TFA (2 mL, 90 % in H₂O) vom Gel abgespalten und mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: H₂O) gereinigt.

Ausbeute: 6.5 mg (0.0049 mmol, $M = 1323.49$ g/mol); 10 %.

¹H-NMR (D₂O, 600 MHz): δ = 7.59-7.34 (m, 2H, H-6_{Thy}), 6.23 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 6.20 (t, ³J = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 4.82 (d, ³J_{1,2} = 1.0 Hz, 2H, H-1_{Man}), 4.46-4.41 (m, 2H, H-3'), 4.36-4.27 (m, 2H, N³CH₂a), 4.14-4.00 (m, 4H, N³CH₂b, H-4'), 3.92-3.84 (m, 2H, OCH₂a), 3.84-3.78 (m, 2H, H-2_{Man}), 3.78-3.70 (m, 4H, OCH₂b, H-6_{Man}), 3.70-3.58 (br m, 14H, C(S)NHCH₂, H-5', H-6_{Man}, H-3_{Man}, H-4_{Man}), 3.42-3.30 (m, 4H, 2x C(O)NHCH₂), 3.29-3.17 (m, 4H, H-5_{Man}, CH₂N(CH₂)₂C(O)), 3.00-2.95 (m, 2H, H₂NCH₂), 2.77 (m, 4H, 2x NCH₂CH₂C(O)), 2.44-2.36 (m, 4H, H-2'), 1.92 (s, 3H, CH₃_{Thy}), 1.90 (s, 3H, CH₃_{Thy}), 1.70-1.59 (m, 6H, H₂NCH₂CH₂, 2x CH₂C(O)), 1.44-1.27 (s, 6H, H₂N(CH₂)₂(CH₂)₃) ppm;

MALDI-ToF-MS: ber.: m/z 1322.573 [M + Na]⁺; gef.: m/z 1323.847 [M + Na]⁺.

(N³-(2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-azido-5',2'-di-desoxythymidin)-C=C-(N³-(2-(α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-O-propargyl-2'-desoxythymidin)ⁱ (71)



Das divalente Glycothymidin-Derivat **79** (10 mg, 8.5 μ mol) wurde in 10 %iger wässr. TFA-Lösung (1 mL) gelöst und 10 min. bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: H₂O) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (5 μ mol, M = 1011.98 g/mol); 58 %.

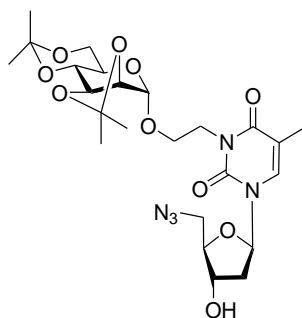
¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 7,64 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 7.54 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.24 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.4 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 6.22 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.4 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 5.31 (m, 2H, C=CH₂), 4.77 (2x s, 2H, 2x H-1_{Man}), 4.32-4.17 (m, 8H, H-3', N³CH₂a, HC≡CCH₂, H-4'), 4.15-4.05 (m, 4H, =CCH₂O), 4.01-3.95 (m, 2H, N³CH₂b), 3.87-3.76 (m, OCH₂, H-2_{Man}), 3.74-3.60 (m, 8H, H-4_{Man} H-6_{Man},

ⁱ Nomenklatur nach Boysen et al.^[29]

H-3', H-5') 3.58-3.54 (m, 4H, H-6b_{Man}, H-3_{Man}), 3.24-3.18 (m, 2H, H-5_{Man}), 2.88 (t, $^4J_{\text{HC}\equiv\text{C},\text{HC}\equiv\text{CCH}_2} = 2.4$ Hz, 1H, HC \equiv C), 2.51-2.45 (m, 2H, 2x H-2'a), 2.40 (ddd, $^3J_{2'a,3'} = 6.4$ Hz, $^3J_{1',2'a} = 6.4$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 14.2$ Hz, 1H, H-2'b), 2.31 (ddd, $^3J_{1',2'b} = 5.7$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 7.7$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 14.0$ Hz, 1H, H-2'b), 1.89 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.2$ Hz, 3H, CH_{3Thy}), 1.88 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.2$ Hz, 3H, CH_{3Thy}) ppm;

MALDI-ToF-MS: ber.: m/z 1034.382 [M+ Na]⁺; gef.: m/z 1034.505 [M + Na]⁺;

***N*³-(2-(2,3:4,6-Di-*O*-isopropyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-azido-5',2'-di-desoxythymidin (73)**



Das Azid **17** (100 mg, 0.374 mmol) wurde in abs. Acetonitril (10 mL) und abs. Dimethylformamid (4 mL) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde mit Isopropyliden-geschütztem Bromethylmannosid **11** (138 mg, 0.374 mmol), DBU (56 μ L, 0.37 mmol) und TBAI (138 mg, 0.374 mmol) versetzt. Es wurde 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wurde dreimal mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc : Cy, 8 : 2) gereinigt. Es wurde ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 128 mg (0.231 mmol, M = 553.56 g/mol), 62 %.

R_f-Wert (EtOAc): 0.35;

Schmp.: 61 °C;

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.34 (q, $^4J_{6,\text{CH}_3}$ = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.31 (dd~t, $^3J_{1',2'a}$ = 6.7 Hz, $^3J_{1',2'b}$ = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 5.05 (s, 1H, H-1_{Man}), 4.47 (ddd~dt, $^3J_{2'a,3'}$ = 4.1 Hz, $^3J_{3',4'}$ = 4.1 Hz, $^3J_{2'b,3'}$ = 7.0 Hz, 1H, H-3'), 4.32 (ddd, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}}$ = 5.9 Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{a}}$ = 7.9 Hz, $^2J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{NCH}_2\text{b}}$ = 13.5 Hz, 1H, N³CH₂a), 4.13 (d, $^3J_{2,3}$ = 5.6 Hz, 1H, H-2_{Man}), 3.90 (ddd, $^3J_{\text{NCH}_2\text{b},\text{OCH}_2\text{a}}$ = 5.6 Hz, $^3J_{\text{NCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{a}}$ = 7.8 Hz, $^2J_{\text{OCH}_2\text{a},\text{OCH}_2\text{b}}$ = 10.3 Hz, 1H, OCH₂a), 3.80 (dd, $^3J_{5,6\text{a}}$ = 5.7 Hz, $^2J_{6\text{a},6\text{b}}$ = 10.8 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.73 (dd, $^3J_{4',5'a}$ = 3.7 Hz, $^2J_{5'a,5'b}$ = 13.1 Hz, 1H, H-5'a), 3.73-3.67 (m, 3H, H-4_{Man}, H-6b_{Man}, OCH₂b) 3.60 (dd, $^3J_{4',5'b}$ = 3.8 Hz, $^2J_{5'a,5'b}$ = 13.2 Hz, 1H, H-5'b), 3.42 (ddd, $^3J_{5,6\text{a}}$ = 5.8 Hz, $^3J_{4,5}$ = 10.3 Hz, $^3J_{5,6\text{b}}$ = 10.3 Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.38 (ddd, $^3J_{2'a,3'}$ = 4.0 Hz, $^3J_{1',2'a}$ = 6.4 Hz, $^2J_{2'a,2'b}$ = 13.9 Hz, 1H, H-2'a), 2.27 (ddd, $^3J_{1',2'b}$ = 6.9 Hz, $^3J_{2'b,3'}$ = 6.9 Hz, $^2J_{2'a,2'b}$ = 13.9 Hz, 1H, H-2'b), 1.96 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3}$ = 1.2 Hz, 3H, CH₃Thy), 1.54 (s, 3H, CH₃Isopr), 1.50 (s, 3H, CH₃Isopr), 1.41 (s, 3H, CH₃Isopr), 1.34 (s, 3H, CH₃Isopr) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ = 162.2 (C4_{Thy}), 149.9 (C2_{Thy}), 132.7 (C6_{Thy}), 109.5 (C5_{Thy}), 108.4 (C_{Isopr}), 98.7 (C_{Isopr}), 96.4 (C1_{Man}), 84.6 (C1'), 83.4 (C4'), 75.0 (C2_{Man}), 73.8 (C3_{Man}), 71.7 (C4_{Man}), 70.6 (C3'), 62.7 (OCH₂), 61.0 (C6_{Man}), 60.5 (C5_{Man}), 51.2 (C5'), 39.5 (C2'), 39.2 (N³CH₂), 28.0, 27.2, 25.2, 17.8 (4x CH₃Isopr), 12.3 (CH₃Thy) ppm;

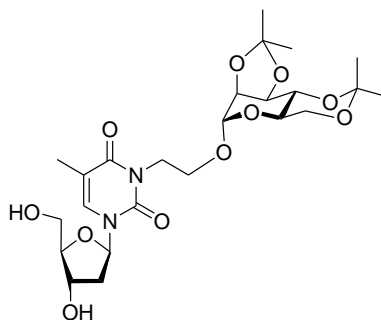
ESI-MS: ber.: m/z 576.228 [M+Na]⁺; gef.: m/z = 576.222 [M + Na]⁺;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu}$ = 2933, 2098, 1703, 1632, 1465, 1370, 1265, 1218, 1198, 1137, 1082, 1045, 1018, 909, 854, 768 cm⁻¹;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +50.77^\circ$ (c = 3.3 mg/mL, CH₂Cl₂);

EA C₂₄H₃₅N₅O₁₀ (M = 553.56 g/mol): ber.: C 52.07, H 6.37, N 12.65; gef.: C 53.84, H 6.82, N 12.76.

***N*³-(2-(2,3:4,6-Di-*O*-isopropyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-2'-desoxythymidin
(75)**



Unter N₂-Atmosphäre wurde 2'-Desoxythymidin (**5**, 66 mg, 0.27 mmol) in abs. Acetonitril (10 mL) und abs. DMF (4 mL) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde mit (2-Bromethyl)-2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- α -D-mannopyranosid **11** (100 mg, 0.272 mmol), DBU (41 μ L, 0.27 mmol) und TBAI (101 mg, 0.272 mmol) versetzt und 3 d bei RT gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Die Lösung wurde viermal mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EE : Cy, 9 : 1) gereinigt. Es wurde ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 87 mg (0.16 mmol, M = 528.55 g/mol), 60 %.

R_f-Wert (EE : Cy, 9.5 : 0.5): 0.35;

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.37 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.33 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.7 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 5.00 (s, 1H, H-1_{Man}), 4.61 (ddd, ³J_{3',4'} = 5.0 Hz, ³J_{2'a,3'} = 6.1 Hz, ³J_{2'b3'} = 6.1 Hz, 1H, H-3'), 4.46 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 5.1 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 9.2 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.7 Hz, 1H, N³CH_{2a}), 4.14 (d, ³J_{2,3} = 5.6 Hz, 1H, H-2_{Man}), 4.03 (dd, ³J_{2,3} = 5.6 Hz, ³J_{3,4} = 7.9 Hz, 1H, H-3_{Man}), 4.00 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2b} = 3.5 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 4.3 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.1 Hz, 1H, N³CH_{2b}), 3.95 (ddd~dt, ³J_{4',5'a} = 3.2 Hz, ³J_{4',5'b} = 3.2 Hz, ³J_{3',4'} = 4.5 Hz, 1H, H-4'), 3.93 (ddd~dt, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 4.5 Hz, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 4.5 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 9.4 Hz, 1H, OCH_{2a}), 3.89 (dd, ³J_{4',5'a} = 2.9 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 12.2 Hz, 1H, H-5'a), 3.83 (dd, ³J_{5,6a} = 5.6 Hz, ²J_{6a,6b} = 10.9 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.78 (dd, ³J_{4',5'b} = 3.0 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 12.2 Hz, 1H, H-5'b), 3.69 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2b} = 3.5 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 4.6 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 9.5 Hz, 1H, OCH_{2b}), 3.67 (dd~t, ³J_{5,6b} = 10.5 Hz,

$^2J_{6a,6b} = 10.5$ Hz, 1H, H-6b_{Man}), 3.66 (dd, $^3J_{3,4} = 2.1$ Hz, $^3J_{4,5} = 10.5$ Hz, 1H, H-4_{Man}), 3.22 (ddd, $^3J_{5,6a} = 5.6$ Hz, $^3J_{4,5} = 10.3$ Hz, $^3J_{5,6b} = 10.3$ Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.40 (ddd~dt, $^3J_{1',2'a} = 6.5$ Hz, $^3J_{2'a,3'} = 6.5$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.9$ Hz, 1H, H-2'a), 2.37 (ddd, $^3J_{2'b,3'} = 5.2$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 6.8$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.9$ Hz, 1H, H-2'b), 1.96 (d, $^4J_{6,CH_3} = 1.1$ Hz, 3H, CH_{3Thy}), 1.52 (s, 3H, CH_{3Isopr}), 1.49 (s, 3H, CH_{3Isopr}), 1.40 (s, 3H, CH_{3Isopr}), 1.33 (s, 3H, CH_{3Isopr}) ppm;

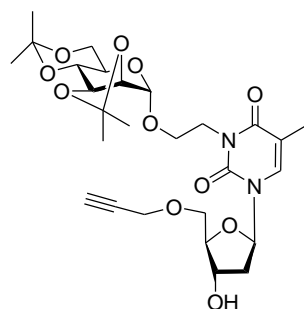
^{13}C -NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 163.2$ (C4_{Thy}), 151.0 (C2_{Thy}), 134.7 (C6_{Thy}), 110.7 (C(CH₃)₂), 109.5 (C5_{Thy}), 99.8 (C(CH₃)₂), 96.9 (C1_{Man}), 86.6 (C4'), 86.0 (C1'), 75.9 (C2_{Man}), 74.7 (C3_{Man}), 72.6 (C4_{Man}), 70.8 (C3'), 63.9 (OCH₂), 62.0 (C6_{Man}), 61.7 (C5'), 61.3 (C5_{Man}), 40.2 (N³CH₂), 40.0 (C2'), 29.0 (CH_{3Isopr}), 28.2 (CH_{3Isopr}), 26.1 (CH_{3Isopr}), 18.8 (CH_{3Isopr}), 13.4 (CH_{3Thy}) ppm;

ESI: ber.: m/z 551.2217 [M+Na]⁺; gef.: m/z 551.2364 [M+Na]⁺;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +21.14^\circ$ (c = 1.8 mg/mL, DCM);

EA C₂₄H₃₆N₂O₁₁ (M = 528.55 g/mol): ber.: C 54.54, H 6.87, N 5.30; gef.: C 51.55, H 7.00, N 4.64.

N³-(2-(2,3;4,6-Di-O-isopropyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-O-propargyl-2'-desoxythymidin (74)



Das TBDMS-geschützte Glycothymidin **77** (440 mg, 0.646 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (10 mL) gelöst und mit TBAF-Lösung (1M in THF; 2.5 mL) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc; 4 : 6) gereinigt.

Ausbeute: 301 mg (0.531 mmol, $M = 566.60$ g/mol), 82 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 3 : 7): 0.2;

Schmp.: 71 °C;

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 7.62$ (q, $^4J_{6,CH_3} = 1.3$ Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.40 (dd, $^3J_{1',2'a} = 6.0$ Hz, $^3J_{1',2'b} = 7.3$ Hz, 1H, H-1'), 5.05 (s, 1H, H-1_{Man}), 4.53 (ddd~dt, $^3J_{2'a,3'} = 3.2$ Hz, $^3J_{3',4'} = 3.2$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 6.2$ Hz, 1H, H-3'), 4.32 (ddd, $^3J_{NCH_2a,OCH_2b} = 5.9$ Hz, $^3J_{NCH_2a,OCH_2a} = 7.9$ Hz, $^2J_{NCH_2a,NCH_2b} = 13.5$ Hz, 1H, N³CH₂a), 4.23 (m_c, 2H, HC≡CCH₂), 4.14-4.05 (m, 4H, H-2_{Man}, N³CH₂b, H-3_{Man}, H-4') 3.89 (ddd, $^3J_{NCH_2b,OCH_2a} = 5.6$ Hz, $^3J_{NCH_2a,OCH_2a} = 7.9$ Hz, $^2J_{OCH_2a,OCH_2b} = 10.3$ Hz, 1H, OCH₂a), 3.85 (dd, $^3J_{4',5'a} = 2.9$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 10.4$ Hz, 1H, H-5'a) 3.80 (dd, $^3J_{5,6a} = 5.8$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 10.8$ Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.74 (dd, $^3J_{4',5'b} = 2.8$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 10.4$ Hz, 1H, H-5'b), 3.73-3.66 (m, 3H, H-4_{Man}, H-6b_{Man}, OCH₂b), 3.41 (ddd, $^3J_{5,6a} = 5.7$ Hz, $^3J_{4,5} = 10.3$ Hz, $^3J_{5,6b} = 10.3$ Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.49 (t, $^4J_{HC=C,HC=CCH_2} = 2.4$ Hz, 1H, HC≡C), 2.36 (ddd, $^3J_{2'a,3'} = 3.4$ Hz, $^3J_{1',2'a} = 6.1$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.7$ Hz, 1H, H-2'a), 2.21 (ddd, $^3J_{1',2'b} = 6.0$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 7.3$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.5$ Hz, 1H, H-2'b), 1.96 (d, $^4J_{6,CH_3} = 1.2$ Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.53 (s, 3H, CH₃ Isopr), 1.50 (s, 3H, CH₃ Isopr), 1.41 (s, 3H, CH₃ Isopr), 1.34 (s, 3H, CH₃ Isopr) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz): $\delta = 163.4$ (C₄_{Thy}), 151.0 (C₂_{Thy}), 134.1 (C₆_{Thy}), 110.0 (C₅_{Thy}), 109.4 (C_{Isopr}), 99.6 (C_{Isopr}), 97.3 (C₁_{Man}), 85.7 (C_{1'}), 85.5 (C_{4'}), 78.9 (HC≡C), 76.0 (C₂_{Man}), 75.4 (HC≡C), 74.8 (C₃_{Man}), 72.6 (C₄_{Man}), 72.2 (C_{3'}), 69.6 (OCH₂), 63.7 (C₆_{Man}), 62.0 (C₅_{Man}), 61.4 (C_{5'}), 58.6 (HC≡CCH₂), 41.1 (C_{2'}), 40.0 (N³CH₂), 29.7, 29.0, 28.1 (3x CH₃ Isopr), 26.1 (3x SiC(CH₃)₃), 18.8 (CH₃ Isopr), 14.2 (SiC(CH₃)₃), 13.3 (CH₃ Thy) ppm;

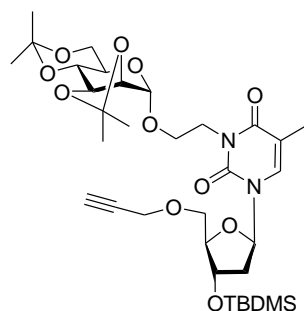
ESI-MS: ber.: m/z 589.237 [M + Na]⁺; gef.: m/z 589.242 [M + Na]⁺;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu} = 3438, 2938, 1698, 1633, 1468, 1371, 1242, 1219, 1197, 1166, 1084, 1042, 1019, 909, 853, 769, 755, 669, 553, 520, 483, 471$ cm⁻¹;

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = + 32.4^\circ$ (c = 10.75 mg/mL, CH₂Cl₂);

EA C₂₇H₃₈N₂O₁₁ (M = 566.60 g/mol): ber.: C 57.23, H 6.76, N 4.94; gef.: C 56.39, H 7.00, N 4.72.

***N*³-(2-(2,3;4,6-Di-*O*-isopropyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-*O*-propargyl-3'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxythymidin (77)**



Thymidin-Derivat **12** (490 mg, 0.762 mmol) wurde in abs. Tetrahydrofuran (10 mL) gelöst, mit Natriumhydrid (37 mg, 0.91 mmol) versetzt und 30 min. mit Ultraschall behandelt. Nach Zugabe von Propargylbromid (103 μ L, 1.37 mmol) wurde das Reaktionsgemisch weitere 3 h im Ultraschallbad belassen. Anschließend wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc; 8 : 2) gereinigt.

Ausbeute: 440 mg (0.646 mmol, M = 680.86 g/mol), 85 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 1 : 1): 0.55;

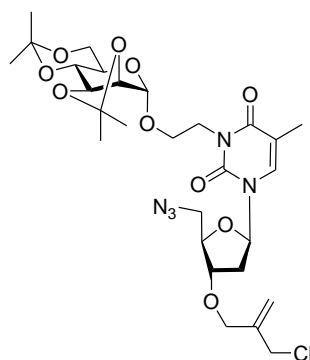
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.52 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.29 (dd~t, ³J_{1',2'a} = 6.7 Hz, ³J_{1',2'b} = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 4.98 (s, 1H, H-1_{Man}), 4.35 (ddd~dt, ³J_{2'a,3'} = 3.3 Hz, ³J_{3',4'} = 3.3 Hz, ³J_{2'b,3'} = 6.2 Hz, 1H, H-3'), 4.23 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 6.2 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 7.6 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.5 Hz, 1H, N³CH₂a), 4.14 (m_c, 2H, HC≡CCH₂), 4.06-3.97 (m, 3H, N³CH₂b, H-2_{Man}, H-3_{Man}), 3.94 (ddd, ³J_{3',4'} = 2.7 Hz, ³J_{4',5'a} = 2.7 Hz, ³J_{4',5'b} = 2.7 Hz, 1H, H-4'), 3.79 (ddd, ³J_{OCH2a,NCH2b} = 6.0 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 7.6 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.4 Hz, 1H, OCH₂a), 3.76-3.71 (m, 2H, H-5'a, H-6a_{Man}), 3.65-3.59 (m, 4H, H-6b_{Man}, H-5'b, H-4_{Man}, OCH₂b), 3.39 (ddd, ³J_{5,6a} = 5.7 Hz, ³J_{4,5} = 10.2 Hz, ³J_{5,6b} = 10.2 Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.40 (t, ⁴J = 2.3 Hz, 1H, C≡CH), 2.17 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 3.4 Hz, ³J_{1',2'a} = 6.2 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.3 Hz, 1H, H-2'a), 2.02 (ddd, ³J_{1',2'b} = 6.2 Hz, ³J_{2'b,3'} = 7.0 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.2 Hz, 1H, H-2'b), 1.87 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.2 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.45 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.41 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.33 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.26 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 0.81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.01 (s, 6H, Si(CH₃)₂) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz): $\delta = 163.4$ (C4_{Thy}), 150.9 (C2_{Thy}), 134.1 (C6_{Thy}), 109.9 (C5_{Thy}), 109.3 (C_{Isopr}), 99.6 (C_{Isopr}), 97.3 (C1_{Man}), 86.2 ($\text{C4}'$), 85.8 ($\text{C1}'$), 78.9 ($\text{HC}\equiv\text{C}$), 76.0 (C2_{Man}), 75.3 ($\text{HC}\equiv\text{C}$), 74.8 (C3_{Man}), 72.7 (C4_{Man}), 72.2 ($\text{C3}'$), 69.2 (OCH_2), 63.9 (C6_{Man}), 62.0 ($\text{C5}'_{\text{Thy}}$), 61.4 (C5_{Man}), 58.6 ($\text{HC}\equiv\text{CCH}_2$), 41.4 ($\text{C2}'$), 39.9 (N^3CH_2), 29.0 , 28.2 , 26.1 ($3\times\text{CH}_3_{\text{Isopr}}$), 25.7 ($3\times\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.8 ($\text{CH}_3_{\text{Isopr}}$), 17.9 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 13.3 (CH_3_{Thy}), -4.7 , -4.9 ($2\times\text{Si}(\text{CH}_3)$) ppm;

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 2958, 2926, 1645, 1260, 1024, 799, 518\text{ cm}^{-1}$;

ESI-MS: ber.: m/z 703.323 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; gef.: m/z 703.324 $[\text{M} + \text{Na}]^+$;

(N^3 -(2-(2,3:4,6-Di-*O*-isopropyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-azido-5',2'-di-desoxythymidin)-Clⁱⁱ (78)



Das Azid **73** (200 mg, 0.361 mmol) wurde in abs. Tetrahydrofuran (9 mL) gelöst, mit Natriumhydrid (18 mg, 0.45 mmol) versetzt und 30 min. mit Ultraschall behandelt. Die Reaktionslösung wurde langsam zu einem Gemisch von Methallyldichlorid (0.5 mL, im Überschuss) und TBAI (240 mg, 0.650 mmol) zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 3 h im Ultraschallbad belassen. Anschließend wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc; 6:4) gereinigt.

ⁱⁱ Nomenklatur nach Boysen et al.^[29]

Ausbeute: 135 mg (0.210 mmol, M = 642.10 g/mol), 58 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 6 : 4): 0.27;

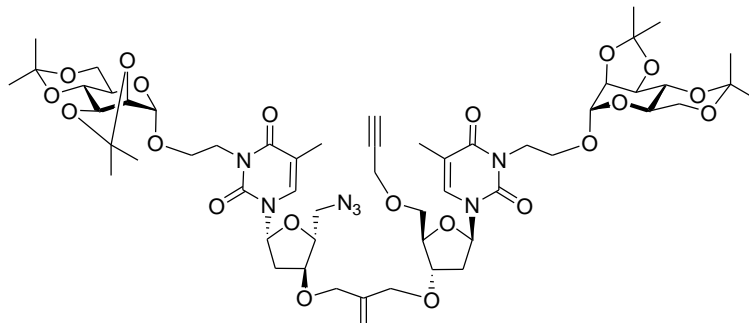
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.32 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.28 (dd, ³J_{1',2'a} = 6.0 Hz, ³J_{1',2'b} = 7.8 Hz, 1H, H-1'), 5.32 (m, 1H, C=CH_{2a}), 5.25 (m, 1H, C=CH_{2b}), 5.05 (s, 1H, H-1_{Man}), 4.32 (ddd, ³J_{NCH2a,OCH2b} = 6.0 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 7.7 Hz, ²J_{NCH2a,NCH2b} = 13.4 Hz, 1H, N³CH_{2a}), 4.15-4.05 (m, 9H, H-3', H-2_{Man}, N³CH_{2b}, H-3_{Man}, H-4', =CCH₂Cl, =CCH₂O), 3.89 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 5.8 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 7.7 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.3 Hz, 1H, OCH_{2a}), 3.81 (dd, ³J_{5,6a} = 5.7 Hz, ²J_{6a,6b} = 10.8 Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.74-3.67 (m, 4H, H-5'a, H-4_{Man}, H-6b_{Man}, OCH_{2b}) 3.56 (dd, ³J_{4',5'b} = 3.6 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 13.2 Hz, 1H, H-5'b), 3.44 (ddd, ³J_{5,6a} = 5.7 Hz, ³J_{4,5} = 10.3 Hz, ³J_{5,6b} = 10.3 Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.46 (ddd, ³J_{2'a,3'} = 2.9 Hz, ³J_{1',2'a} = 6.1 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 13.8 Hz, 1H, H-2'a), 2.15 (ddd, ³J_{1',2'b} = 6.7 Hz, ³J_{2'b,3'} = 6.7 Hz, ²J_{2'a,2'b} = 14.1 Hz, 1H, H-2'b), 1.96 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.54 (s, 3H, CH₃ Isopr), 1.50 (s, 3H, CH₃ Isopr), 1.41 (s, 3H, CH₃ Isopr), 1.34 (s, 3H, CH₃ Isopr) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ = 163.1 (C₄_{Thy}), 150.8 (C₂_{Thy}), 141.2 (C=CH₂), 133.5 (C₆_{Thy}), 117.3 (C=CH₂), 110.6 (C₅_{Thy}), 109.4 (C_{Isopr}), 99.6 (C_{Isopr}), 97.3 (C₁_{Man}), 85.8 (C_{1'}), 82.4 (C_{4'}), 79.1 (C₂_{Man}), 76.0 (C₃_{Man}), 74.8 (C₄_{Man}), 72.6 (C_{3'}), 69.7 (=CCH₂O), 63.7 (OCH₂), 62.0 (C₆_{Man}), 61.5 (C₅_{Man}), 52.6 (C_{5'}), 45.0 (=CCH₂Cl), 40.1 (N³CH₂), 37.3 (C_{2'}), 29.1, 28.2, 26.1, 18.8 (4x CH₃ Isopr), 13.3 (CH₃_{Thy}) ppm;

ESI-MS: ber.: *m/z* 664.236 [M + Na]⁺; gef.: *m/z* 664.233 [M + Na]⁺;

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2963, 2102, 1705, 1645, 1464, 1370, 1260, 1219, 1198, 1082, 1017, 910, 856, 797, 768, 666, 520 cm⁻¹;

(*N*³-(2-(2,3:4,6-Di-*O*-isopropyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-azido-5',2'-desoxythymidin)-C=C-(*N*³-(2-(2,3:4,6-di-*O*-isoprpyliden- α -D-mannopyranosyloxy)ethyl)-5'-*O*-propargyl-2'-desoxythymidin)ⁱⁱⁱ (79)



Das Propargyl-Glycothymidin **74** (80 mg, 0.14 mmol) wurde in abs. Tetrahydrofuran (1 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (7 mg, 0.2 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min. mit Ultraschall behandelt. Nach Zugabe von Azidoglycothymidin **78** (109 mg, 0.170 mmol) und TBAI (94 mg, 0.255 mmol) wurde der Reaktionsansatz 3 h im Ultraschallbad belassen und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc; 1 : 1) gereinigt.

Ausbeute: 99 mg (0.08 mmol, M = 1172.23 g/mol), 59 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 3 : 7): 0.32;

Schmp.: 99-104 °C;

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 7,60 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 7.33 (q, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 1H, H-6_{Thy}), 6.38 (dd, ³J_{1',2'a} = 5.8 Hz, ³J_{1',2'b} = 8.3 Hz, 1H, H-1'), 6.28 (dd, ³J_{1',2'a} = 6.1 Hz, ³J_{1',2'b} = 8.0 Hz, 1H, H-1'), 5.23 (m, 1H, C=CH_{2a}), 5.22 (m, 1H, C=CH_{2b}), 5.05 (s, 2H, 2x H-1_{Man}), 4.33-4.29 (m, 2H, 2x N³CH_{2a}), 4.24 (m_c, 2H, HC≡CCH₂), 4.17-3.97 (m, 14H, 2x H-3', 2x H-2_{Man}, 2x N³CH_{2b}, 2x H-3_{Man}, 2x H-4', 2x =CCH₂O), 3.88 (ddd, ³J_{NCH2b,OCH2a} = 5.8 Hz, ³J_{NCH2a,OCH2a} = 7.7 Hz, ²J_{OCH2a,OCH2b} = 10.3 Hz, 2H, 2x OCH_{2a}), 3.84 (dd, ³J_{4',5'a} = 2.8 Hz, ²J_{5'a,5'b} = 10.4 Hz, 1H, H-5'a), 3.81 (dd, ³J_{5,6a} = 5.7 Hz, ²J_{6a,6b} = 10.8 Hz,

ⁱⁱⁱ Nomenklatur nach Boysen et al.^[29]

1H, H-6a_{Man}), 3.80 (dd, $^3J_{5,6a} = 5.7$ Hz, $^2J_{6a,6b} = 10.8$ Hz, 1H, H-6a_{Man}), 3.73-3.66 (m, 8H, H-5'a, H-5'b, 2x H-4_{Man}, 2x H-6b_{Man}, 2x OCH₂b), 3.57 (dd, $^3J_{4',5'b} = 3.7$ Hz, $^2J_{5'a,5'b} = 13.2$ Hz, 1H, H-5'b), 3.44 (ddd, $^3J_{5,6a} = 5.7$ Hz, $^3J_{4,5} = 10.2$ Hz, $^3J_{5,6b} = 10.2$ Hz, 1H, H-5_{Man}), 3.43 (ddd, $^3J_{5,6a} = 5.7$ Hz, $^3J_{4,5} = 9.1$ Hz, $^3J_{5,6b} = 9.1$ Hz, 1H, H-5_{Man}), 2.52 (t, $^4J_{\text{HC}\equiv\text{C},\text{HC}\equiv\text{CCH}_2} = 2.3$ Hz, 1H, HC \equiv C), 2.44 (ddd, $^3J_{2'a,3'} = 2.8$ Hz, $^3J_{1',2'a} = 6.1$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.9$ Hz, 1H, H-2'a), 2.42 (ddd, $^3J_{2'a,3'} = 2.5$ Hz, $^3J_{1',2'a} = 5.9$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.7$ Hz, 1H, H-2'a), 2.15 (ddd, $^3J_{1',2'b} = 6.8$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 6.8$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 14.3$ Hz, 1H, H-2'b), 2.09 (ddd, $^3J_{1',2'b} = 5.8$ Hz, $^3J_{2'b,3'} = 8.3$ Hz, $^2J_{2'a,2'b} = 13.9$ Hz, 1H, H-2'b), 1.96 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.3$ Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.96 (d, $^4J_{6,\text{CH}_3} = 1.3$ Hz, 3H, CH₃_{Thy}), 1.53 (s, 6H, 2xCH₃_{Isopr}), 1.50 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.50 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.41 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.41 (s, 3H, CH₃_{Isopr}), 1.34 (s, 6H, 2xCH₃_{Isopr}) ppm;

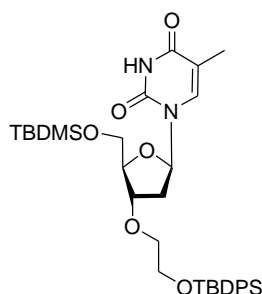
¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz): $\delta = 163.3$ (C₄_{Thy}), 163.1 (C₄_{Thy}), 150.9 (C₂_{Thy}), 150.8 (C₂_{Thy}), 141.4 (C=CH₂), 134.0 (C₆_{Thy}), 133.5 (C₆_{Thy}), 115.3 (C=CH₂), 110.6 (C₅_{Thy}), 110.2 (C₅_{Thy}), 109.4 (2xC_{Isopr}), 99.6 (2xC_{Isopr}), 97.3 (C₁_{Man}), 97.2 (C₁_{Man}), 85.9 (C₁'), 85.8 (C₁'), 83.5 (C₄'), 82.4 (C₄'_{Thy}), 79.8 (C₂_{Man}), 79.1 (C₂_{Man}), 78.8 (HC \equiv C), 75.9 (C₃_{Man}), 75.5 (HC \equiv C), 74.8 (C₄_{Man}, C₃_{Man}), 72.6 (C₃', C₄_{Man}), 70.2 (C₃'), 69.8 (2x=CCH₂O), 64.3 (OCH₂), 63.7 (C₆_{Man}, OCH₂), 61.9 (C₆_{Man}), 61.4 (2x C₅_{Man}, C₅'), 58.6 (HC \equiv CCH₂), 52.7 (C₅'), 40.1 (N³CH₂), 40.0 (N³CH₂), 37.8 (C₂'), 37.3 (C₂'), 30.6, 29.7, 29.0, 28.2, 26.1, 19.1, 18.8 (8x CH₃_{Isopr}), 13.7 (CH₃_{Thy}), 13.3 (CH₃_{Thy}) ppm;

ESI-MS: ber.: m/z 1194.506 [M + Na]⁺; gef.: m/z 1194.501 [M + Na]⁺;

IR (ATR-IR): $\tilde{\nu} = 2928, 2099, 1703, 1643, 1463, 1369, 1243, 1219, 1198, 1167, 1084, 1045, 1021, 908, 856, 810, 768, 669$ cm⁻¹.

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = +47.2^\circ$ (c = 9.8 mg/mL, CH₂Cl₂);

EA C₅₅H₇₇N₇O₂₁ (M = 1172.23 g/mol): ber.: C 56.35, H 6.62, N 8.36; gef.: C 57.44, H 6.93, N 7.76.

5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3'-*O*-[2(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)ethyl]-2'-desoxythymidin (82)

TBDMS-geschütztes Thymidin **35** (20 mg, 0.06 mmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre in abs. THF (5 mL) gelöst und mit Natriumhydrid (6 mg, 0.1 mol) versetzt. Das TBDPS-geschützte Bromethanol (19 mg, 0.05 mmol) wurde mit TBAI (48 mg, 0.14 mmol) in abs. THF (5 mL) suspendiert. Beide Lösungen wurden parallel 30 min. mit Ultraschall behandelt. Die Lösung des geschützten Bromethanols wurde langsam der Lösung des Thymidin-Derivats hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h mit Ultraschall behandelt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cy : EtOAc; 4 : 1) gereinigt.

Ausbeute: 28 mg (0.04 mmol, M = 638.94 g/mol), 84 %.

R_f-Wert (Cy : EtOAc; 1 : 4): 0.35;

ESI-MS: ber.: m/z 661.311 [M+Na]⁺; gef.: m/z 661.311 [M+Na]⁺.

5.3 Protokoll zur Glasbeschichtung

Für die Immobilisierung wurden unterschiedlich funktionalisierte Silane verwendet. Amin-funktionalisierte Silane wie 3-Aminopropyltrimethoxysilan oder 11-Aminoundecyltrimethoxysilan wurden für die Kupplung mit Isothiocyanaten eingesetzt. 11-Azidoundecyltrimethoxysilan wurde für die Cycloaddition mit Alkinen verwendet und 11-Pentafluorophenylundecanoatrimethoxysilan mit Aminen gekuppelt. Die verwendeten Silane sind in Abbildung 95 gezeigt.

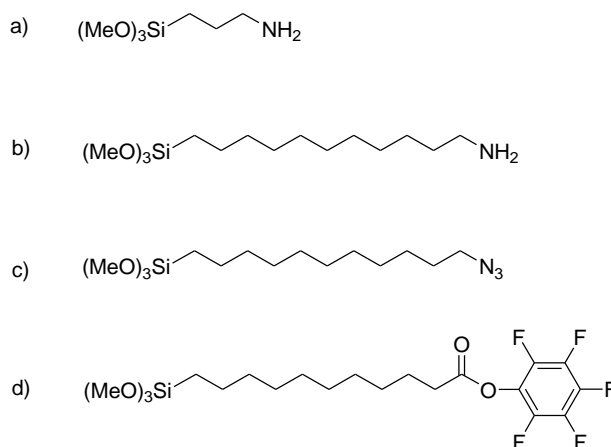


Abbildung 95: Für die Immobilisierung auf Quarzglas verwendete Silane. 3-Aminopropyl-trimethoxysilan (a); 11-Aminoundecyltrimethoxysilan (b); 11-Azidoundecyltrimethoxysilan (c); 11-Pentafluorophenylundecanoatrimethoxysilan (d).

Die Thioharnstoffkupplung von Glycothymidin-Isothiocyanaten und Amin-funktionalisierten Silanen erfolgte in Lösung, da die Reaktion auf der Oberfläche nur langsam und unvollständig abläuft. Für alle anderen Kupplungen wurden zunächst die Silane auf die Oberfläche immobilisiert und anschließend auf der Oberfläche mit den entsprechenden Glycothymidinen gekuppelt. Die Thioharnstoffkupplung erfolgte nach folgender allgemeiner Arbeitsvorschrift:

Thioharnstoffkupplung in Lösung

Das Isothiocyanat (1 Äquiv.) wurde unter Stickstoffatmosphäre in abs. DMF (1 mL/15 mg) gelöst und mit dem Amino-Silan (1 Äquiv.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h bei 60 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung für die Immobilisierung verwendet.

Immobilisierung auf Quarzglas-Substraten

Die Quarzglas-Substrate wurden vor Verwendung nach folgendem Reinigungsprotokoll gereinigt und aktiviert:

Das Substrat wurde in einer Lösung von konz. Salzsäure in Methanol (1:1) 1 h mit Ultraschall behandelt. Es wurde nacheinander mit Methanol und Wasser (bidest.) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Das trockene Substrat wurde über Nacht in Piranha-Lösung ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$; 7 : 3) eingelegt. Nach erneutem Spülen mit Wasser (bidest.) wurde das Substrat entweder in Wasser (bidest.) gelagert oder im Stickstoffstrom getrocknet und sofort verwendet.^[213]

Zur Immobilisierung wurde das Silan in Dichlormethan oder Dimethylformamid (löslichkeitsbedingt!) gelöst. Das Quarzglas-Substrat wurde bei 37 °C über Nacht in der Lösung geschüttelt. Es wurde nacheinander mit DCM bzw. DMF, Methanol und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

1,3-dipolare Cycloaddition von Alkinen und Aziden auf der Oberfläche

Das Alkin (1 Äquiv.) wurde in einem Gemisch von Ethanol (2 mL/10 mg) und Wasser (1 ml/10 mg) gelöst und mit Kupfer(II)sulfat (0.4 Äquiv.) und Natriumascorbat (0.8 Äquiv.) versetzt. Das gereinigte und aktivierte Quarzglas-Substrat wurde für 7 Tage bei Raumtemperatur in die Lösung eingelegt. Es wurde nacheinander mit Ethanol und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Peptidkupplung auf der Oberfläche

Das Amin wurde in abs. Dimethylformamid (1 mL/mg) gelöst und das aktivierte Substrat für 16 h bei 37 °C in der Lösung inkubiert. Es wurde nacheinander mit Dimethylformamid, Methanol und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Nachweis der Immobilisierung

Der Nachweis der Immobilisierung der Glycothymidine auf der Quarzglas-Oberfläche erfolgte UV-spektroskopisch.

5.4 Protokoll zu den bakteriellen Adhäsionstests

Zur Durchführung der bakteriellen Adhäsionstests^[96,97] wurden folgende Lösungen verwendet:

LB-Medium: 10.0 g Trypton, 10.0 g Natriumchlorid und 5.00 g Hefe-Extrakt wurden in 1.00 L bidest. Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7.0 eingestellt. Nach Sterilisation im Autoklaven wurden 100 mg Ampicillin und 50 mg Chloramphenicol zugegeben.

Carbonatpuffer (pH 9.5): 1.59 g Natriumcarbonat und 2.52 g Natriumhydrogencarbonat wurden in 1.00 L bidest. Wasser gelöst.

PBS-Puffer (pH 7.2): 8.00 g Natriumchlorid, 200 mg Kaliumchlorid, 1.44 g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 200 mg Kaliumdihydrogenphosphat wurden in 1.00 L bidest. Wasser gelöst.

PBST-Puffer (pH 7.2): PBS-Puffer + 0.05 % v/v Tween® 20.

pH-Werte wurden mit 0.1 M HCl oder 0.1 M NaOH eingestellt.

Kultivierung der Bakterien

200 µL einer homogenen Bakteriensuspension des *E. coli*-Stammes PKL1162 in PBS wurden in LB-Medium gegeben und bei 37 °C über Nacht im Inkubator bei 80 UpM inkubiert. Die Bakterien wurden am nächsten Tag geerntet. Dazu wurde die Bakteriensuspension 15 min. bei 4000 UpM zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und der Rückstand mit PBS-Puffer gewaschen. Das trockene Pellet wurde in PBS-Puffer mit einer Konzentration von 2 mg/mL resuspendiert.

Bakterieller Adhäsionsassay auf der Polystyrol-Mikrotiteroberfläche

Um die Glycothymidine kovalent an die Mikrotiteroberfläche (96 Well Black Immobilizer Amino™ F96 Microwell™) zu binden wurde Carbonatpuffer pH 9.5 (100 µL) in alle Wells vorgelegt und das Amin in serieller Verdünnung zugegeben. Die Beschichtung wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter leichter Agitation durchgeführt. Anschließend wurden die Wells dreimal mit PBST (150 µL) gewaschen. Die Wells wurden durch Inkubation mit

Ethanolamin-Lösung (10 mM in PBS-Puffer, 120 μ L) für 2 h bei Raumtemperatur unter stetiger Agitation blockiert. Anschließend wurden die Wells erneut dreimal mit PBST (150 μ L) gewaschen. PBS (50 μ L) und eine Bakteriensuspension *E. coli* (pKL1162) (50 μ L, 2 mg/mL in PBS) wurde in alle Wells gegeben und die Platte wurde 90 min. im Schüttelinkubator (80 UpM) bei 37°C inkubiert. Die Wells wurden dreimal mit PBS (150 μ L) gewaschen. PBS (100 μ L) wurde in alle Wells gegeben und die Oberflächen-gebundenen Bakterien durch Fluoreszenz-Readout detektiert (Exitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 535 nm).

[2+2]-Cycloaddition auf der Mikrotiterplatte

Für die Belichtung auf der Oberfläche wurden die Aminoglycothymidine wie oben beschrieben kovalent auf den Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (150 μ L) wurde PBS (120 μ L) in alle Wells gegeben. Der Teil der Platte, der nicht belichtet werden sollte wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und der zu bestrahlende Teil wurde 3 h bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm mit einer Quecksilberlampe (150 W) unter Benutzung eines Cut-Off-Filters belichtet. Die Wells wurden trocken geklopft und durch Inkubation mit Ethanolamin-Lösung (10 mM in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur unter stetiger Agitation blockiert. Der bakterielle Adhäsionsassay auf der Oberfläche wurde nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll weiter fortgeführt.

Bakterieller Adhäsionsassay auf der Quarzglas-Oberfläche

Die Immobilisierung der Glycothymidine auf der Quarzglas-Oberfläche erfolgte wie im Immobilisierungsprotokoll beschrieben (Abschnitt 5.3). Hierfür wurden die Quarzglas-Objektträger auf das Maß 2.5 x 1 cm zugeschnitten und im Reagenzglas beschichtet.

Für den bakteriellen Adhäsionstest wurden die beschichteten Gläser mit PBS (1.5 mL) und einer Bakteriensuspension *E. coli* (pKL1162) (1.5 mL, 2 mg/mL in PBS) im Reagenzglas 90 min. im Schüttelinkubator (80 UpM) bei 37°C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde abgegossen und die Gläser dreimal mit PBS gewaschen. PBS (2 mL) wurde in die Wells einer 6-Well gegeben, die Gläser wurden in die 6-Well Platte gelegt und die Oberflächen-gebundenen Bakterien durch Fluoreszenz-Readout detektiert (Exitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 535 nm).

[2+2]-Cycloaddition auf der Quarzglasoberfläche

Für die Belichtung auf der Oberfläche wurden die Glycothymidine wie oben beschrieben über ein Silan auf die Oberfläche immobilisiert. Die im Stickstoffstrom getrockneten Gläser wurden 3 h bei einer Wellenlänge von $\lambda > 295$ nm mit einer Quecksilberlampe (150 W) unter Benutzung eines Cut-Off-Filters belichtet. Der Nachweis der Dimerisierung erfolgte UV-spektroskopisch. Der bakterielle Adhäsionsassay auf der Oberfläche wurde nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll weiter fortgeführt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, *Brock Mikrobiologie*. 9. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, **2003**.
- [2] L. C. Junqueira, J. Carneiro, *Histologie*. 3. Aufl., Springer, Berlin, **1991**.
- [3] H.-J. Gabius, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1321–1330, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *100*, 1321–1330.
- [4] H. Rüdiger, H.-J. Gabius, *Glycoconj. J.* **2001**, *18*, 589–613.
- [5] B. G. Davis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 3215–3237.
- [6] R. A. Laine, *Glycobiol.* **1994**, *4*, 759–767.
- [7] T. K. Lindhorst, *Chemie in unserer Zeit* **2000**, 38–52.
- [8] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [9] P. Sears, C. H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446–2471, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *16*, 2300–2324.
- [10] L. Stryer, *Biochemie*. 3. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1994**.
- [11] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357–2364.
- [12] R. S. Haltiwanger, J. B. Lowe, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 491–537.
- [13] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*. 1. Aufl., Wiley, New York, **1990**.
- [14] A. J. Petrescu, M. R. Wormland, R. A. Dwek, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 600–607.
- [15] L. Ellgaard, A. Helenius, *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* **2003**, *4*, 181–191.
- [16] C. D. Rillahan, J. C. Paulson, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 797–823.
- [17] T. K. Lindhorst, *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*. 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [18] E. G. Berger, E. Buddecke, J. P. Kamerling, A. Kabota, J. C. Paulson, J. F. G. Vliegthart, *Experientia* **1982**, *38*, 1129–1162.
- [19] Y. D. Vankar, R. R. Schmidt, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 201–216.
- [20] S. Degroote, J. Wolthoorn, G. van Meer, *Sem. Cell. Dev. Biol.* **2004**, *15*, 375–387.
- [21] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632–1670, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532–1568
- [22] A. Huwiler, T. Kolter, J. Pfeilschifter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1485*, 63–99.
- [23] T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4683–4696.
- [24] M. G. Paulick, C. R. Bertozzi, *Biochem.* **2008**, *47*, 6991–7000.

- [25] R. U. Lemieux, *Human Blood Groups and Carbohydrate Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, **1978**.
- [26] W. T. J. Morgan, W. M. Watkins, *Brit. Med. Bull.* **1969**, *25*, 30–34.
- [27] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674.
- [28] E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833–862.
- [29] M. M. K. Boysen, K. Elsner, O. Sperling, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4376–4386.
- [30] N. Sharon, H. Lis, *Science* **1989**, *246*, 227–234.
- [31] P. Crocker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 609–615.
- [32] T. B. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, A. Engering, B. A. 't Hart, Y. van Kooyk, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 33–54.
- [33] D. Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 187–197.
- [34] R. U. Lemieux, *Chem. Soc. Rev.* **1989**, *18*, 347.
- [35] W. I. Weis, K. Drickamer, *Structure* **1994**, *2*, 1227–1240.
- [36] K. K.-S. Ng, K. Drickamer, W. I. Weis, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 663–674.
- [37] R. P. McEver, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 581–586.
- [38] I. Bucior, *J. Cell Biol.* **2004**, *165*, 529–537.
- [39] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953.
- [40] L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254.
- [41] Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327.
- [42] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441–473.
- [43] N. Smiljanic, V. Moreau, D. Yockot, J. M. Benito, J. M. García Fernández, F. Djedaïni-Pilard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5465–5468, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5591–5594.
- [44] Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* **1978**, *67*, 509–514.
- [45] C. F. Brewer, M. Miceli, L. Baum, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 616–623.
- [46] C. Sisu, A. J. Baron, H. M. Branderhorst, S. D. Connell, C. A. G. M. Weijers, R. de Vries, E. D. Hayes, A. V. Pukin, M. Gilbert, R. J. Pieters, H. Zuilhof, G. M. Visser, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 329–337.
- [47] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348–2368, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2408–2429.
- [48] V. Wittmann, R. J. Pieters, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4492.
- [49] M. Kleinert, T. Winkler, A. Terfort, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2118.
- [50] M. Dubber, O. Sperling, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3901.
- [51] J. D. Badjić, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723–732.

- [52] P. Bach, M. Bols, A. Damsgård, U. Hansen, A. Lohse in: *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Springer, Berlin, **2001**.
- [53] E. Leclerc, X. Pannecoucke, M. Ethève-Quellejeu, M. Sollogoub, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4270–4283.
- [54] S. H. Rouhanifard, L. U. Nordstrøm, T. Zheng, P. Wu, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4284–4296.
- [55] L. L. Kiessling, J. C. Grim, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4476–4491.
- [56] N. C. Reichardt, M. Martin-Lomas, S. Penadés, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4358–4376.
- [57] C. Unverzagt, Y. Kajihara, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4408.
- [58] A. Imberty, Y. M. Chabre, R. Roy, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7490–7499.
- [59] N. Kaila, B. E. Thomas IV, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 566–601.
- [60] A. Titz, J. Patton, M. Smiesko, Z. Radic, O. Schwardt, J. L. Magnani, B. Ernst, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 19–27.
- [61] O. Srinivas, *Glycobiol.* **2005**, *15*, 861–873.
- [62] O. Srinivas, N. Mitra, A. Surolia, N. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2124–2125.
- [63] H. R. Bourne, *Science* **2000**, *289*, 733–734.
- [64] W. M. Oldham, H. E. Hamm, *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* **2008**, *9*, 60–71.
- [65] K. D. Ridge, K. Palczewski, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9297–9301.
- [66] D. L. Nelson, M. M. Cox, A. L. Lehninger, *Principles of Biochemistry*. 3. Aufl., Worth Publishers, New York, **2000**.
- [67] V. Baron, P. Kaliman, N. Gautier, E. van Obberghen, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 23290–23294.
- [68] J. Lee, P. F. Pilch, S. E. Shoelson, S. F. Scarlata, *Biochem.* **1997**, *36*, 2701–2708.
- [69] G. Seisenberger, *Science* **2001**, *294*, 1929–1932.
- [70] I. Willner, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 347–356.
- [71] B. L. Feringa, *Molecular Switches*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [72] E. C. Friedberg, *Nature* **2003**, *421*, 436–440.
- [73] W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, *315*, 625–629.
- [74] Y. Inaki, *Organic Photochemistry and Photobiology*, *104*, CRC Press LCC, Boca Raton, **2004**.
- [75] Y. Inaki, H. Hiratsuka, *J. Photopol. Sci. Technol.* **2000**, *13*, 739–744.
- [76] W. Horspool, F. Lenci *DNA damage and repair: Photochemistry*, CRC Press; Boca Raton, **2004**.
- [77] M. McCullagh, M. Hariharan, F. D. Lewis, D. Markovitsi, T. Douki, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 5215–5221.
- [78] S. Mouret, C. Phillippe, J. Gracia-Chantegrel, A. Banyasz, S. Karpati, D. Markovitsi, T. Douki, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1706–1711.

- [79] F. Boussicault, O. Krüger, M. Robert, U. Wille, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2742–2750.
- [80] T. Ostrowski, J.-C. Maurizot, M.-T. Adeline, J.-L. Fourrey, P. Clivio, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6502–6510.
- [81] Y.-J. Ai, R.-Z. Liao, S.-F. Chen, Y. Luo, W.-H. Fang, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 14096–14102.
- [82] A. Besaratinia, J.-I. Yoon, C. Schroeder, S. E. Bradforth, M. Cockburn, G. P. Pfeifer, *FASEB J.* **2011**, *25*, 3079–3091.
- [83] R. Beukers, W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *41*, 550.
- [84] T. Douki, J. Cadet, *Biochem.* **1994**, *33*, 11942–11950.
- [85] R. B. Setlow, *Science* **1966**, *153*, 379.
- [86] Y. Zhang, T. Iwata, J. Yamamoto, K. Hitomi, S. Iwai, T. Todo, E. D. Getzoff, H. Kandori, *Biochem.* **2011**, *50*, 3591–3598.
- [87] T. K. Lindhorst *Ligands for FimH*, **2011** in: *Synthesis and Biological Applications of Glycoconjugates*, O. Renaudet, N. Spinelli (Eds.), Bentham eBooks 12-35.
- [88] M. Vetsch, C. Puorger, T. Spirig, U. Grauschopf, E. U. Weber-Ban, R. Glockshuber, *Nature* **2004**, *431*, 329–333.
- [89] J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. de Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C.-S. Hung, J. Pinkner, R. Slättegård, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, H. de Greve, *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 441–455.
- [90] D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. D. Knight, *Science* **1999**, *285*, 1061–1066.
- [91] C.-S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. deFusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren, *Mol. Microbiol.* **2002**, *44*, 903–915.
- [92] A. Wellens, C. Garofalo, H. Nguyen, N. van Gerven, R. Slättegård, J.-P. Hernalsteens, L. Wyns, S. Oscarson, H. de Greve, S. Hultgren, J. Bouckaert, S. Zhang, *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2040.
- [93] O. Sperling, A. Fuchs, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3913.
- [94] T. K. Lindhorst, C. Kieburg, U. Krallmann-Wenzel, *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 605–613.
- [95] S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, T. K. Lindhorst, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 2193–2200.
- [96] M. Hartmann, A. K. Horst, P. Klemm, T. K. Lindhorst, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 330.
- [97] K. Schwekendiek, *Dissertation* **2010**, CAU Kiel.
- [98] S. Park, J. C. Gildersleeve, O. Blixt, I. Shin, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4310.
- [99] O. van Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. Die, D. R. Burton, I. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C. H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 17033–17038.
- [100] Y. Liu, A. S. Palma, T. Feizi, *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 647–656.

- [101] J. W. Wehner, M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Res.* **2013**, *371*, 22–31.
- [102] C. Maierhofer, K. Rohmer, V. Wittmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7661–7676.
- [103] F. Fazio, M. C. Bryan, O. van Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397–14402.
- [104] M. A. Brun, M. D. Disney, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 421–424.
- [105] J. W. Wehner, M. J. Weissenborn, M. Hartmann, C. J. Gray, R. Šardžik, C. E. Eyers, S. L. Flitsch, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8919.
- [106] C. Grabosch, M. Kind, Y. Gies, F. Schweighöfer, A. Terfort, T. K. Lindhorst, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, accepted.
- [107] W. C. T. Feizi, *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* **2004**, *5*, 582–588.
- [108] M. G. Friedel, J. C. Pieck, J. Klages, C. Dauth, H. Kessler, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6081–6094.
- [109] A. Kawai, O. Hara, Y. Hamada, T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6331–6334.
- [110] G. Zemplén, E. Pascu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 1613.
- [111] W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1517–1527.
- [112] K. Schwekendiek, H. Kobarg, L. Daumlechner, F. D. Sönnichsen, T. K. Lindhorst, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9399.
- [113] L. Daumlechner, *Diplomarbeit* **2008**, CAU Kiel.
- [114] S. Svedhem, L. Öhberg, S. Borrelli, R. Valiokas, M. Andersson, S. Oscarson, S. C. T. Svensson, B. Liedberg, P. Konradsson, *Langmuir* **2002**, *18*, 2848–2858.
- [115] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Bio.* **2002**, *9*, 443–454.
- [116] M. Kleinert, N. Röckendorf, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 3931–3940.
- [117] C. Grabosch, M. Kleinert, T. Lindhorst, *Synthesis* **2010**, *2010*, 828–836.
- [118] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481–4483.
- [119] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Science* **1988**, *240*, 62–63.
- [120] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321–335.
- [121] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 522–528, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 506–512.
- [122] A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533–1554.
- [123] L. Li, S. Chen, S. Jiang, *Langmuir* **2003**, *19*, 2974–2982.
- [124] S. Svedhem, C.-Å. Hollander, J. Shi, P. Konradsson, B. Liedberg, S. C. T. Svensson, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4494–4503.
- [125] M. Mrksich, J. R. Grunwell, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12009–12010.
- [126] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1169.
- [127] J. J. Gooding, S. Ciampi, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2704.
- [128] J. K. Lee, Y. S. Chi, I. S. Choi, *Langmuir* **2004**, *20*, 3844–3847.

- [129] J. Li, P. S. Thiara, M. Mrksich, *Langmuir* **2007**, *23*, 11826–11835.
- [130] X. Qian, S. J. Metallo, I. S. Choi, H. Wu, M. N. Liang, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1805–1810.
- [131] N. Crivillers, M. Mas-Torrent, S. Perruchas, N. Roques, J. Vidal-Gancedo, J. Veciana, C. Rovira, L. Basabe-Desmots, B. J. Ravoo, M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2265–2269.
- [132] D. Samanta, A. Sarkar, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2567.
- [133] M. Mrksich, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 267–273.
- [134] L. Ban, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3444–3447, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *120*, 3444–3447.
- [135] M. Kind, C. Wöll, *Prog. Surf. Sci.* **2009**, *84*, 230–278.
- [136] G. E. McGuire, M. L. Swanson, N. R. Parikh, S. Simko, P. S. Weiss, J. H. Ferris, R. J. Nemanich, D. R. Chopra, A. R. Chourasia, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 199–220.
- [137] R. Arnold, *Dissertation* **2001**, Ruhr-Universität Bochum.
- [138] J. Zhou, D. A. Beattie, R. Sedev, J. Ralston, *Langmuir* **2007**, *23*, 9170–9177.
- [139] P. Dutta, N. Ray, S. Roy, A. K. Dasgupta, O. Bouloussa, A. Sarkar, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5123.
- [140] G. Elender, M. Kühner, E. Sackmann, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 565–577.
- [141] O. van Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. Die, D. R. Burton, I. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C. H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 17033–17038.
- [142] E. W. Adams, D. M. Ratner, H. R. Bokesch, J. B. McMahon, B. R. O'Keefe, P. H. Seeberger, *Chem. Bio.* **2004**, *11*, 875–881.
- [143] C. O. Mellet, J. M. G. Fernández, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 819–822.
- [144] M. D. Disney, P. H. Seeberger, *Chem. Bio.* **2004**, *11*, 1701–1707.
- [145] K. Larsen, M. B. Thygesen, F. Guillaumie, W. G. Willats, K. J. Jensen, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1209–1234.
- [146] M.-R. Lee, I. Shin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4269–4272.
- [147] O. Michel, B. J. Ravoo, *Langmuir* **2008**, *24*, 12116–12118.
- [148] C. Wendeln, A. Heile, H. F. Arlinghaus, B. J. Ravoo, *Langmuir* **2010**, *26*, 4933–4940.
- [149] C. Wendeln, S. Rinnen, C. Schulz, H. F. Arlinghaus, B. J. Ravoo, *Langmuir* **2010**, *26*, 15966–15971.
- [150] S. R. Wasserman, Y. T. Tao, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1989**, *5*, 1074–1087.
- [151] P. Silberzan, L. Léger, D. Ausserré, J. J. Benattar, *Langmuir* **1991**, *7*, 1647–1651.
- [152] L. T. Zhuravlev, *Langmuir* **1987**, *3*, 316–318.
- [153] M. S. Azam, S. L. Fenwick, J. M. Gibbs-Davis, *Langmuir* **2011**, *27*, 741–750.
- [154] J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92–98.
- [155] C. Durfor, D. Turner, J. Georger, B. Peek, D. Stenger, *Langmuir* **1994**, *10*, 148–152.

- [156] S. Onclin, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6438–6462, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6282–6304.
- [157] Z. Sekkat, J. Wood, Y. Geerts, W. Knoll, *Langmuir* **1995**, *11*, 2856–2859.
- [158] M. Min, G. S. Bang, H. Lee, B.-C. Yu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5232.
- [159] T. Seki, M. Sakuragi, Y. Kawanishi, T. Tamaki, R. Fukuda, K. Ichimura, Y. Suzuki, *Langmuir* **1993**, *9*, 211–218.
- [160] L. M. Siewierski, W. J. Brittain, S. Petrash, M. D. Foster, *Langmuir* **1996**, *12*, 5838–5844.
- [161] Z. Sekkat, J. Wood, Y. Geerts, W. Knoll, *Langmuir* **1996**, *12*, 2976–2980.
- [162] C. Haensch, S. Hoepfner, U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2323.
- [163] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *41*, 2596–2599, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [164] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249.
- [165] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 2004–2021.
- [166] P. van der Voort, E. F. Vansant, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, *19*, 2723–2752.
- [167] T. Horr, P. Arora, *Colloids Surf., A* **1997**, *126*, 113–121.
- [168] Y. Ofir, N. Zenou, I. Goykhman, S. Yitzchaik, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 8002–8009.
- [169] N. Papukashvili, *Dissertation* **2009**, Universität Hamburg.
- [170] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [171] H. Skarpos, S. N. Osipov, D. V. Vorob'eva, I. L. Odinets, E. Lork, G.-V. Röschenthaler, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2361.
- [172] S. G. Gouin, L. Bultel, C. Falentin, J. Kovensky, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 1160–1167.
- [173] T. Lummerstorfer, H. Hoffmann, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 3963–3966.
- [174] J. Mehlich, B. J. Ravoo, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4108.
- [175] E. P. Carpenter, K. Beis, A. D. Cameron, S. Iwata, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 581–586.
- [176] G. G. Privé, *Methods* **2007**, *41*, 388–397.
- [177] D. V. Tulumello, C. M. Deber, *Biochem.* **2009**, *48*, 12096–12103.
- [178] P. V. Santacroce, A. Basu, *Angew. Chem.* **2003**, *42*, 95–98, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 95–98.
- [179] J. Mares, J. U. Müller, A. Skirgailiene, A. Neumoin, C. A. Bewley, R. R. Schmidt, O. Zerbe, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1764–1773.
- [180] M. C. Bryan, O. Plettenburg, P. Sears, D. Rabuka, S. Wacowich-Sgarbi, C.-H. Wong, *Chem. Bio.* **2002**, *9*, 713–720.
- [181] C. H. Wong, M. C. Bryan, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 218–225.
- [182] T. K. Lindhorst, *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1996**, *44*, 1073–1079.

- [183] R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1869.
- [184] M. Lahmann, T. K. Lindhorst, S. Oscarson, *Top. Curr. Chem.* **2009**, 288, 183.
- [185] C. Kieburg, T. K. Lindhorst, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3885–3888.
- [186] K. Bezouška, V. Křen, C. Kieburg, T. K. Lindhorst, *FEBS Lett* **1998**, 426, 243–247.
- [187] P. Krist, L. Vannucci, M. Kuzma, P. Man, K. Sadalapure, A. Patel, K. Bezouška, M. Pospíšil, L. Petruš, T. K. Lindhorst, V. Křen, *ChemBioChem* **2004**, 5, 445–452.
- [188] M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Chem. Commun.* **1998**, 1265–1266.
- [189] M. M. K. Boysen, T. K. Lindhorst, *Org. Lett.* **1999**, 1, 1925–1927.
- [190] M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Org. Lett.* **2001**, 3, 4019–4022.
- [191] C. D. Heidecke, T. K. Lindhorst, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9056–9067.
- [192] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis* **1978**, 155–158.
- [193] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, 17, 117–132.
- [194] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Macromolecules* **1986**, 19, 2466–2468.
- [195] A. Müller, *Diplomarbeit* **2012**, CAU Kiel.
- [196] S. Spjut, M. Pudelko, M. Hartmann, M. Elofsson, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 349–357.
- [197] F. K. Wallner, H. A. Norberg, A. I. Johansson, M. Mogemark, M. Elofsson, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 309.
- [198] M. Mogemark, F. Gardmo, T. Tengel, J. Kihlberg, M. Elofsson, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1770.
- [199] M. Jayaraman, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12996–12997.
- [200] K. Elsner, M. M. Boysen, T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 1715–1725.
- [201] F. Santoyo-González, A. Torres-Pinedo, A. Sánchez-Ortega, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4409–4414.
- [202] P. Chirakul, S. T. Sigurdsson, *Org. Lett.* **2003**, 5, 917–919.
- [203] Y. Byun, J. Yan, A. S. Al-Madhoun, J. Johnsamuel, W. Yang, R. F. Barth, S. Eriksson, W. Tjarks, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1188–1198.
- [204] V. Roy, L. Colombeau, R. Zerrouki, P. Krausz, *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 1829–1831.
- [205] J. Hovinen, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 851–855.
- [206] K. Teste, L. Colombeau, A. Hadj-Bouazza, R. Lucas, R. Zerrouki, P. Krausz, Y. Champavier, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 1490–1495.
- [207] J. C. Wu, Z. Xi, C. Gioeli, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **1991**, 47, 2237–2254.
- [208] K. Seio, T. Terada, M. Mizuta, A. Ohkubo, H. Taguchi, M. Sekine, *Helv. Chim. Acta* **2007**, 90, 1946–1965.
- [209] M. Nakane, S. Ichikawa, A. Matsuda, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1842–1851.
- [210] C. V. Miduturu, S. K. Silverman, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 5774–5777.

- [211] R. Lucas, V. Neto, A. Hadj Bouazza, R. Zerrouki, R. Granet, P. Krausz, Y. Champavier, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1004–1007.
- [212] E. Kaiser, R. Colescott, C. Bossinger, P. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [213] J. J. Cras, C. A. Rowe-Taitt, D. A. Nivens, F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 683–688.

Ein herzliches DANKE an

Frau Prof. Dr. THISBE K. LINDHORST, für die Aufnahme in den Arbeitskreis, die interessante und herausfordernde Themenstellung und Ihre Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. FRANK D. SÖNNICHSEN, für die spontane Übernahme der Zweitkorrektur.

die Mitarbeiter der NMR-Abteilung: Prof. Dr. FRANK SÖNNICHSEN, GITTA KOHLMAYER-YLMAZ, MARION HÖFTMANN und HOLGER FRANZEN sowie die Mitarbeiter der massenspektrometrischen Abteilung DIRK MEYER, ULRIKE DRIELING und ROLF MEYER, für die Aufnahme zahlreicher Spektren und ihre Unterstützung.

CHRISTINE HAUG, REGINA MEINLSCHMIDT und VANESSA KAHL, für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung in allen organisatorischen Dingen.

ANDREAS WILMS für die Versorgung mit allen Chemikalien für den täglichen Bedarf und die lustigen Anekdoten zwischendurch.

MONIKA BÄNSCH für die Versorgung mit Handtüchern, Papier und Seife und für die Hilfe beim Stricken der Ferse.

RÜDIGER KARGOLL, für die Reparatur vieler Elektrogeräte und die Maßanfertigung von Haltern für die Quarz-Substrate.

ELWIRA KLIMA-BARTCZAK - für deine Hilfe bei der Synthese, die zahlreichen Messungen und besonders für deine offene und herzliche Art und dafür dass ich immer mit dir reden konnte.

meine ehemaligen und aktuellen Arbeitskollegen im ARBEITSKREIS LINDHORST, für das gute Arbeitsklima, eure Hilfsbereitschaft und die vielen Diskussionen chemischer und nicht-chemischer Natur. Besonders danke ich:

KIRSTEN SCHWEKENDIEK, ALEXANDER SCHIERHOLT, FEMKE BEIROTH und ANNE MÜLLER - für eure Unterstützung und Freundschaft während meiner Promotion. Außerdem: KIRSTEN, für die gemeinsame Suche nach dem besten Sonntagsbrunch in Kiel; ALEX, für lustige Spieleabende und FEMKE, für die schöne Zeit in Budapest. ANNE MÜLLER, CLAUDIA FESSELE und ANNA CIUK, für lustige Weinabende und die Erfindung des Weinfestes. CHRISTIAN MÜLLER, für deine Hilfe beim Vernichten von Ouzo-

Vorräten. ARNE STINDT für das Auflegen der Musik und die gute Unterhaltung im Labor. KATHARINA KOLBE für die Einführung ins S1-Labor. BIANCA KUNZ, für die Hilfsbereitschaft gerade in meiner Anfangszeit. VIJAYANAND CHANDRASEKARAN für viele gute Gespräche auf dem gemeinsamen Nachhauseweg und Tipps für meinen Singapur-Besuch. ALEXANDER THRUN, für die Schoki-Schublade und die Unterhaltung im Labor. TOBIAS KELLER, für die vielen guten Gespräche und die Einführung des monatlichen Treffens in der Forstbaumschule. EUGEN JOHANNES, für das Lösen aller PC-Probleme. JÖRN SCHMIDT-LASSEN für das Einsammeln an der Bushaltestelle. MICHELLE FERNANDEZ-BIBER, dafür, dass „Coldplay“ „Juli“ übertönt hat. Meiner F3-Praktikantin, LINA-SOPHIE NOLL, für die Unterstützung bei der Synthese, dein großes Engagement und die gute Laune im Labor.

MARSCHA RIED, für deine Bereitschaft alle Fragen zur Glasbeschichtung geduldig zu beantworten.

FEMKE BEIROTH, MARIE PETERSEN und KEVIN FERNANDO, für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

MARIE PETERSEN, ANDREA HAHN, FRANK WITTE, CHRISTOPH FREUDENHAMMER, REBECCA BICHEL UND DIANA SCHINKEL für die Freitags-Essen, die auch der stressigsten Woche einen schönen Abschluss gegeben haben. Außerdem an: ANDREA HAHN, für den Spaß, Spaß, Spaß beim Zusammenschreiben und deine Unterstützung und Freundschaft. Ich freue mich auf die Toskana. MARIE PETERSEN, für viele aufmunternde Telefonate, Archritte und dafür, dass du mich nicht Bankkauffrau werden lassen hast. FRANK WITTE, für die aufmunternden Emails vom anderen Ende der Welt. CHRISTOPH FREUDENHAMMER, für die spontane Anreise zu jeder Party vom anderen Ende Deutschlands. Danke an die Mädels, für den Tequila zu jedem Anlass. Und an Tequila und Kaffee: Danke für eure Wirkung!

meine Familie, die DAUMLECHNERS, MICHELNS und FERNANDOS, und OMA RÖDEL, für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch während der letzten Jahre und für die Versuche zu begreifen, was ich eigentlich mache.

Mein besonderer Dank gilt KEVIN FERNANDO für den Rückhalt, dein Verständnis und deine Unterstützung, für das gute Essen und alles andere.

DANKE!

