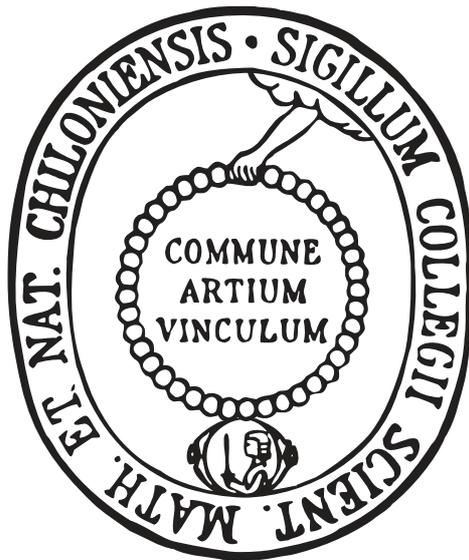


**Untersuchung und Kontrolle bakterieller Adhäsion:
Synthese, spezifische Markierung und photochemische Funktionalisierung
des bakteriellen Lektins FimH**



Dissertation

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

vorgelegt von

Femke-Isabell Beiroth

Kiel 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. K. Lindhorst

2. Gutachter: Prof. Dr. F. Sönnichsen

Tag der Disputation: 21.09.2015

Zum Druck genehmigt: Kiel, 28.09.2015

Der Dekan

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Ich habe die Arbeit nicht an anderer Stelle eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Femke-Isabell Beiroth

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis Juli 2015 am Otto-Diels-Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst angefertigt.

Die Bearbeitung der in Kapitel 3.1 beschriebenen Zielstellung der Dissertation wurde bereits in der eigenen Diplomarbeit begonnen. Es wurden übernommen:

- Die einleitenden Abbildungen 24, 25, 26 und 29.
- Die literaturbekannte Syntheseroute zu **18**, die in Abbildung 31 geschildert ist.
- Die Synthesen der Zwischenstufen **3**, **19** und **22**.

Während der Promotionszeit wurden folgende Arbeiten veröffentlicht, die nicht in dieser Dissertationsschrift enthalten sind:

M. Hartmann, H. Papavlassopoulos, V. Chandrasekaran, C. Grabosch, F. Beiroth, T. K. Lindhorst, C. Röhl, Inhibition of bacterial adhesion to live human cells: Activity and cytotoxicity of synthetic mannosides. *FEBS Lett.* **2012**, 586, 1459-1465.

V. Chandrasekaran, K. Kolbe, F. Beiroth, T. K. Lindhorst, Synthesis and testing of first azobenzene mannobioside as photoswitchable ligand for the bacterial lectin FimH. *Beilstein J.Org. Chem.* **2013**, 9, 223-233.

Kurzfassung

Bakterielle Infektionen stellen aufgrund von zunehmender Resistenzentwicklung immer noch ein globales Gesundheitsproblem dar. Die Adhäsion von Bakterienzellen, die im Kontext bakterieller Infektionen steht, ist unter anderem von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen abhängig. Diese finden zwischen bakteriellen Lektinen und Kohlenhydratbestandteilen der zellspezifischen Glycokalyx statt. Für die Untersuchung dieser Wechselwirkungen auf molekularer Ebene wurden Typ-1-fimbrierte *E. coli*-Zellen bzw. deren adhäsives Lektin FimH als Modellsystem ausgewählt. FimH steuert die Mannose-spezifische Adhäsion der Bakterien maßgeblich. In dieser Arbeit galt es, diese molekularen Wechselwirkungen zwischen dem Lektin FimH und Mannosylresten in Lösung zu untersuchen und die Bindungstasche des Proteins so zu modifizieren, dass der Prozess der Adhäsion verhindert und photochemisch kontrolliert werden kann. Für die Realisierung dieses Projekts wurden drei verschiedene Zielstellungen bearbeitet. Zum einen wurden verschiedene mono- und bifunktionelle photolabile Mannosidliganden entworfen, mit Hilfe derer sich die Kohlenhydrat-Bindungstasche des Lektins FimH markieren lässt. Für das Ligandendesign wurden im Vorfeld Computer-gestützte Docking-Studien durchgeführt, um Affinität und Markierungspotential zu beurteilen. Die vielversprechendsten Liganden wurden synthetisiert und in Bestrahlungsexperimenten für die Markierung von FimH eingesetzt. Zweitens galt es, photoschaltbare Mannosidliganden mit Epoxidfunktion für die kovalente Markierung von FimH darzustellen. Eine inkorporierte photosensible Einheit sollte dabei die Inaktivierung bzw. gezielte Aktivierung der Proteinfunktion durch photochemisches Schalten ermöglichen. Dazu wurden verschiedene Liganden und ein Referenzligand entworfen, in Docking-Studien optimiert und synthetisiert. Drittens wurde eine DMAP-vermittelte Ligationsstrategie genutzt, um ein Azobenzolderivat am Eingang der Kohlenhydrat-Bindungstasche des FimH zu fixieren. Durch *cis/trans*-Isomerisierung der Azobenzol-(N=N)-Doppelbindung lässt sich so der Zugang zur Bindungstasche sterisch kontrollieren. Für dieses Teilprojekt wurden verschiedene DMAP-funktionalisierte Mannoside und unterschiedlich substituierte Azobenzolthioester benötigt, die theoretisch untersucht und synthetisiert wurden. In biologischen Tests in Kombination mit massenspektrometrischer Untersuchung konnte über die hier dargestellte Forschung das bakterielle Lektin FimH erstmals chemisch spezifisch modifiziert werden.

Abstract

Due to an expansion of resistances, bacterial infections still pose a global health problem. The adhesion of bacterial cells is important in the context of bacterial infection and is determined by carbohydrate-protein interactions. These take place between bacterial lectins and carbohydrate components of the cell-specific glycocalyx. For the study of these interactions in molecular detail type 1 fimbriated *E. coli* cells and more precisely their adhesive lectin FimH were selected as a model system. FimH significantly controls the mannose-specific adhesion of the bacteria. The aim of this work was to investigate the molecular interactions between the lectin FimH and mannoside residues in solution and to modify the binding site of the protein in order to prevent and photochemically control the process of adhesion. Three approaches were pursued for the realization of this goal. First, different mono- and bifunctional photolabile mannoside ligands were designed in order to label the binding pocket of the lectin FimH. The ligands were assessed in advance by computer-aided docking studies to estimate their affinity and labelling potential. The most promising structures were synthesized and used in irradiation experiments for FimH labelling. Secondly, the preparation of photo-switchable mannoside ligands with an epoxide function was considered. An incorporated photo-sensitive unit allows the inactivation or activation, respectively, of the targeted protein function by photochemical switching. Reactive ligands and a reference ligand were designed, optimized in docking studies and synthesized. Thirdly, a DMAP-mediated ligation strategy was used to modify the entrance of the binding site of FimH with an azobenzene derivative. By *cis/trans* isomerization of the azobenzene-(N=N)-double bond the access to the active site can be sterically controlled. For this sub project different DMAP-functionalized mannosides and different functionalized azobenzene thioesters were required, which were theoretically investigated and synthesized. Biological experiments in combination with mass spectrometric analysis proved that the herein described research allowed the first site-specific modification of the bacterial lectin FimH.

Allgemeine Vorbemerkung zum Aufbau der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beinhaltet drei Teilprojekte, wobei der wichtigste dieser Projektteile in Kapitel 3.3 beschrieben ist. Die Einleitung in Kapitel 1 stellt allgemeingültige Informationen über das Thema der Dissertation zusammen. Im Ergebnisteil in Kapitel 3 beginnt jedes Teilprojekt mit einer detaillierteren, auf die spezielle Thematik zugeschnittenen, Einleitung.

Alle massenspektrometrischen Experimente in den Kapiteln 3.1 und 3.3 wurden in Kooperation mit T. OVERATH und T. KOUDELKA aus der Arbeitsgruppe THOLEY (Kiel) durchgeführt. Die Oberflächenfunktionalisierung auf Gold (Kapitel 3.3.5) und die anschließende Messung der bakteriellen Adhäsion wurde von J. SCHERR aus der Arbeitsgruppe TERFORT (Frankfurt) vorgenommen.

Im experimentellen Teil (Kapitel 5) sind die Synthesevorschriften, die Durchführung der theoretischen Arbeiten (mit jeweils einer kurzen Beschreibung der theoretischen Grundlagen) sowie die biologischen Versuchsdurchführungen enthalten.

Die meisten Massenspektren aus den biologischen Versuchen und alle Daten der durchgeführten Rechnungen wurden im Anhang (Kapitel 6) zusammengestellt.

Allgemeine Abkürzungen

abs.	absolut
Ac	acetyl-
ARG (R)	Arginin
arom.	aromatisch
ber.	berechnet
br (NMR)	breit
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CI	Chemische Ionisation
COSY	<i>engl.</i> : correlated spectroscopy
C	Konzentration
CRD	<i>engl.</i> : carbohydrate recogniton domain
D	Tag
d (NMR)	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	Elementaranalyse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EG	Ethylenglycol
ESI-MS	<i>engl.</i> : electron spray ionization mass spectrometry
FT	Fourier-Transformation
G	Gramm
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GLU €	Glutaminsäure
ges.	gesättigt
GFP	<i>engl.</i> : green fluorescent protein
H	Stunde

HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HMBC	<i>engl.</i> : heteronuclear multiple bond correlation
HREI-MS	<i>engl.</i> : high resolution electron ionization mass spectrometry
HSQC	<i>engl.</i> : heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
i. Vak.	im Vakuum
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ISC	<i>engl.</i> : intersystem crossing
IR	infrarot
konz.	konzentriert
Lit.	Literatur
LYS (K)	Lysin
m (NMR)	Multiplett
M	Molare Masse
MALDI-Tof-MS	<i>engl.</i> : matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
MeMan	Methyl- α -D-mannopyranosid
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NMR	<i>engl.</i> : nuclear magnetic resonance
OM	<i>engl.</i> : outer membrane
org.	organisch
pPL1162	Plasmid Per Klemm 1162
ppm	<i>engl.</i> : parts per million
quant.	quantitativ
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor

Raumtemp.	Raumtemperatur
RP	<i>engl.</i> : reversed phase
Rpm	<i>engl.</i> : revolutions per minute
s (NMR)	Singulett
SER (S)	Serin
Smp.	Schmelzpunkt
STD-NMR	<i>engl.</i> : saturation-transfer difference NMR
t (NMR)	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilanyloxy-
TFA	Trifluoressigsäure
THR (T)	Threonin
Ts	Tosyl-
TsCl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
TYR (Y)	Tyrosin
unsp.	unspezifisch
UV	ultraviolett
wässr.	wässrige
Zers.	Zersetzung

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen im Kontext der bakteriellen Adhäsion	2
1.2 Das Lektin FimH	4
1.3 Methoden zur selektiven Proteinmodifizierung	8
2 Projektidee	16
3 Ergebnisse	23
3.1 Design, Synthese und Anwendung photolabiler Mannosidliganden zur Markierung der Bindungstasche des bakteriellen Lektins FimH.....	23
3.1.1 Design der photolabilen Liganden – Docking Studien	27
3.1.2 Synthese des funktionalisierten Diazirin-Photophors	31
3.1.3 Synthese photolabiler Mannosidliganden	33
3.1.4 Photochemische Markierung von FimH	37
3.2 Design und Synthese photoschaltbarer Liganden für das bakterielle Lektin FimH.....	44
3.2.1 Docking der photoschaltbaren FimH-Liganden.....	47
3.2.2 Synthese der photoschaltbaren Liganden.....	51
3.3 Verwendung einer DMAP-vermittelten Ligationsstrategie zur Modifizierung des bakteriellen Lektins FimH	55
3.3.1 Docking der DMAP-funktionalisierten Mannosidliganden.....	58
3.3.2 Synthese und Testung zweier DMAP-funktionalisierter Mannosidliganden	60
3.3.3 Synthese funktionalisierter Azobenzolthioester	63
3.3.4 Theoretische Betrachtung der FimH-Modifizierung.....	68
3.3.5 Modifizierung von FimH	82
4 Zusammenfassung und Ausblick	100
4.1 Design, Synthese und Anwendung photolabiler Mannosidliganden zur Markierung der Bindungstasche des bakteriellen Lektins FimH.....	101
4.2 Design und Synthese photoschaltbarer Liganden für das bakterielle Lektin FimH.....	103
4.3 Verwendung einer DMAP-vermittelten Ligationsstrategie zur Modifizierung des bakteriellen Lektins FimH	104

5 Experimenteller Teil	108
5.1 Allgemeine Methoden	108
5.2 Durchgeführte Synthesen.....	111
5.3 Angaben zur Durchführung der theoretischen Arbeiten	161
5.3.1 Rechnungen mit Sybyl	161
5.3.2 Rechnungen mit der Schrödinger Software	161
5.3.3 Molekulare Oberflächen	165
5.4 Biologische Methoden- und Versuchsbeschreibungen.....	167
6 Anhang	174
6.1 MS-Versuche.....	174
6.1.1 Spektren Photomarkierung (Kapitel 3.1)	174
6.1.2 Spektren DMAP-Ligationschemie (Kapitel 3.3)	183
6.2 Durchgeführte Rechnungen.....	202
6.2.1 Docking mit FlexX (Sybyl)	203
6.2.2 Dockingergebnisse mit Glide (Schrödinger)	208
6.2.3 Ligand-Interaktionsdiagramme	228
6.2.4 Ergebnisse der Diederwinkelscans	231
7 Literatur	288
9 Danksagung	299

1 Einleitung

Chemie ist der Grundstein allen Lebens. Aus einfachen chemischen Verbindungen und komplexeren biochemischen Makromolekülen sind alle Lebewesen aufgebaut, deren Basiseinheit eine einzelne Zelle darstellt. Seit jeher sind WissenschaftlerInnen auf der ganzen Welt mit der Entschlüsselung jeder Struktur, jedes molekularen Ablaufs, jeder Funktion und Wirkweise beschäftigt. Nach der Aufklärung der Struktur der DNA durch WATSON und CRICK im Jahr 1953^[1] wurde 1966 der genetische Code aller Lebewesen entschlüsselt. Diese Meilensteine in der Wissenschaft ermöglichten es schließlich auch die Vorgänge der Proteinbiosynthese auf molekularer Ebene zu verstehen. Zu jener Zeit wurden die Funktionen von Kohlenhydratmolekülen in unserem Körper weitestgehend vernachlässigt und als nicht wichtig angesehen. Dabei ist die Entschlüsselung des „Zuckercodes“^[2] aufgrund der strukturellen Vielfalt der Kohlenhydrate wohl eine der größten Herausforderungen für die Naturwissenschaft. Allein die Vielfältigkeit der verzweigten Strukturen von Oligosacchariden ist kaum vorstellbar. Durch neue Synthese- und Analysemethoden ist die Glycowissenschaft in den letzten Jahren entscheidend vorangekommen;^[3] und trotz allem: „Zucker sind die dunkle Materie der Biologie“.^[4] Dieses Zitat von A. VARKI soll ausdrücken wie wenig wir bisher über die Kohlenhydrate in unserem Körper wissen. Bei dem Stichwort „Zucker“ denken die meisten an Süßigkeiten, Energiegehalt, Übergewicht oder auch an Karies. Doch diese Begriffe beschreiben nicht annähernd den Umfang der Funktionen und Auswirkungen, die Kohlenhydrate in unserem Leben und besonders in unserem Körper einnehmen. Sie sind an den meisten zellulären Prozessen entscheidend beteiligt und mehr als „nur“ Energielieferanten. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Zellkommunikation, der Immunantwort, bei Stoffwechselvorgängen, der Embryogenese und bei der Gewebeorganisation.^[5] Als posttranslationale Modifikation von Proteinen kontrollieren sie deren Struktur, Funktion und Dynamik. Auf supramolekularer Ebene jedoch sind die Funktionen der Kohlenhydrate und im speziellen die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen im Detail bisher nicht abschließend verstanden. Dabei könnten diese Informationen auch die Erforschung und Bekämpfung von Krankheiten wie Infektionen und Krebs entscheidend voranbringen und den Weg freimachen für die Entwicklung neuer, effektiver Wirkstoffe und Therapien.

1.1 Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen im Kontext der bakteriellen Adhäsion

Molekulare Erkennungsprozesse basieren fast immer auf Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen und haben eine große Bedeutung für das Zellgeschehen. Zell-Zell-Kommunikation und Zelldifferenzierung sind dabei nur einige Beispiele für biologische Prozesse, die durch Interaktionen dieser Art gesteuert werden.^[6]

Bei Wechselwirkungen auf der Zelloberfläche ist meist die Glycokalyx (Abb. 1) involviert.^[7-8] Diese bis über 100 nm dicke Kohlenhydratummantelung jeder eukaryontischen Zelle besteht aus hochverzweigten Oligosaccharidstrukturen, die über die Bindung an Proteine oder Lipide in der Zellmembran verankert sind. Die Zusammensetzung der Glycokalyx ist zellspezifisch und variiert je nach Entwicklungsstand oder ihrem pathologischen Zustand. Sie besitzt eine

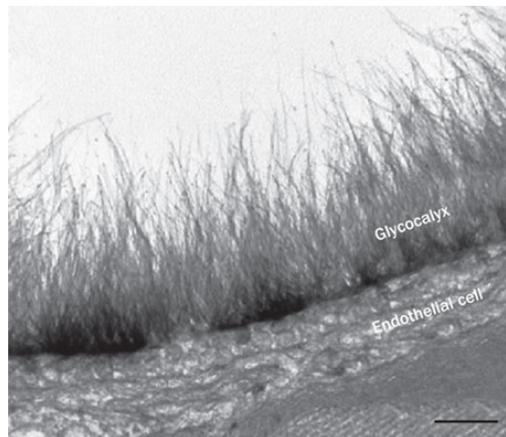


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glycokalyx einer Endothelzelle.^[9]

hohe strukturelle Komplexität, entsprechend ist ihre Funktion und Beteiligung an biologischen Prozessen vielfältig. Bisher konnten diese Zusammenhänge noch nicht in vollem Umfang erfasst werden. Spezifische Interaktionen zwischen den Kohlenhydraten der Zelloberfläche und Proteinen sind besonders facettenreiche und bedeutsame molekulare Wechselwirkungen. Die in diesen Prozessen involvierten Proteine sind die sogenannten Lektine^[10] (lateinisch: *legere* = sammeln, wählen); sie binden spezifisch Kohlenhydrate, besitzen aber weder enzymatische Aktivität noch Eigenschaften von Antikörpern.^[11] In ihrer Struktur bergen sie mindestens eine Kohlenhydrat-erkennende Domäne (engl.: *carbohydrate recognition domain*; CRD),^[12] an die der spezifische Kohlenhydratligand gebunden wird. Obwohl die Affinität der Kohlenhydratliganden zu den Lektinen normalerweise sehr schwach ist (mikromolare bis millimolare K_D -Werte), steuern sie wichtige Prozesse im Körper. Sie findet man vor allem in Pflanzen, aber auch Organismen können Lektine exprimieren. Viele Bakterien, insbesondere Enterobakterien, können an die glycosylierte Zelloberfläche von Erythrozyten mit Hilfe von

Lektinen adhären. Fast immer ist diese Fähigkeit mit dem Vorkommen haarartiger, multipler Proteinstränge assoziiert, welche in der äußeren Membran der Zellwand Gram-negativer Bakterien verankert sind. Eine adhäsive Untereinheit am äußeren Ende der Stränge vermittelt die Kohlenhydrat-Lektin Bindung an die glycosylierte Zelloberfläche. Gram-negative Bakterien exprimieren einige hundert dieser adhäsiven Organellen auf ihrer Oberfläche. Von den sogenannten Fimbrien (auch Pili genannt) sind verschiedene Typen mit unterschiedlichen Kohlenhydrat-Spezifitäten klassifiziert. In *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien sind vor allem Typ-1-Fimbrien wichtig, die für α -D-Mannose spezifisch sind. Daneben sind aber auch P-, S- und G-Fimbrien auf der Bakterienoberfläche präsent, die ihrerseits Gal α 1,4Gal, Neu5Ac α 2,3Gal bzw. GalNAc binden.^[13] Durch die Fimbrien wird die Kohlenhydrat-spezifische Adhäsion der Bakterien an die Zelloberfläche sowie die Zellagglutination ermöglicht. Die Glycokalyx schafft damit die Voraussetzung für die Kolonisation der Bakterien auf der Zelloberfläche. Bildet sich ein sogenannter Biofilm^[14] auf den Zellen, kann eine für beide Seiten vorteilhafte Symbiose zwischen Mikroorganismus und Wirt entstehen. *E. coli*-Bakterien beispielsweise produzieren das Vitamin K im Dickdarm. Befallen diese oder andere Mikroorganismen jedoch ein nicht vorhergesehenes Habitat oder sind die Bakterien genetisch nur leicht verändert, kann aus dem Nutzen ein Schaden entstehen, der sich unter anderem durch Entzündungen, Zelltod oder unkontrolliertes Zellwachstum zeigen kann.^[15] Bakterielle Infektionen stellen immer noch ein globales Problem für die Gesundheit dar.^[16] So sind die uropathogenen *E. coli*- (UPEC) Bakterien für bis zu 90 % aller Harnwegsinfektionen

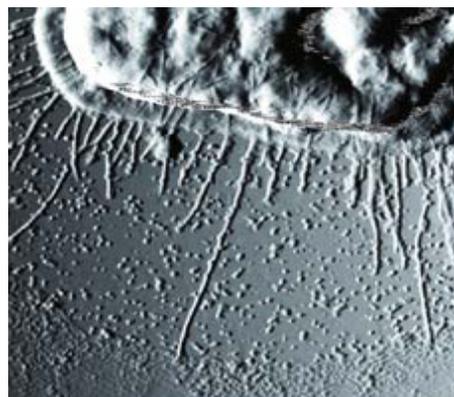


Abb. 2: TEM-Aufnahme eines *E. coli*-Bakteriums, die besonders gut die fadenförmigen Fimbrien des Bakteriums darstellt.^[17]

verantwortlich. Zwar können die meisten Infektionen durch Bakterien mit Antibiotika behandelt werden, die Resistenzentwicklung aber stellt inzwischen ein zunehmend großes

Problem dar, so dass dringend neue Strategien zur Behandlung bakterieller Infektionen und ihrer Vorbeugung benötigt werden. Dazu ist es allerdings wichtig, die Mechanismen der bakteriellen Adhäsion im Zusammenhang mit der Glycokalyx-Struktur genau zu verstehen und die entsprechende Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkung auf supramolekularer Ebene aufzuklären.

1.2 Das Lektin *FimH*

Bei den uropathogenen *E. coli*-Bakterien sind besonders die Typ-1-Fimbrien für die bakterielle Virulenz von Bedeutung.^[17] Diese Organellen bestehen aus Hunderten einzelner FimA-Protein-Untereinheiten und einer Spitze, welche sich aus den Proteinen FimF und FimG sowie dem Lektin FimH^[18] zusammensetzt (Abb. 3). Die Biosynthese der Fimbrien verläuft über den so bezeichneten *chaperone-usher pathway*.^[19] Die einzelnen Fim-Proteine (FimA, FimF, FimG und FimH) gelangen dabei zunächst in nicht gefalteter Struktur in das Periplasma des

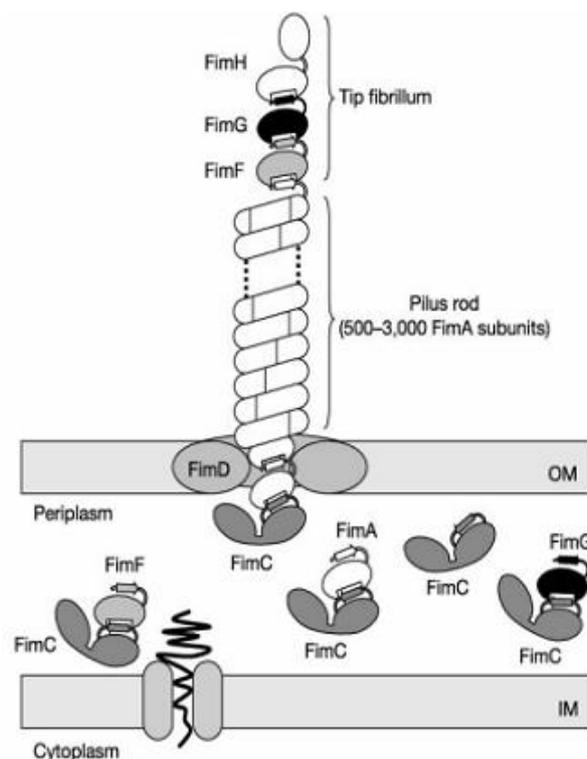


Abb. 3: Schematische Darstellung der Biosynthese der Typ-1-Fimbrien von *E. coli*-Bakterien.^[20]

Bakteriums, wo jedes von ihnen einen Komplex mit dem *chaperone*-Protein FimC bildet. Diese Komplexierung löst die korrekte Faltung der Proteine aus. Durch die Wechselwirkung des

Komplexes mit dem *usher*-Protein FimD, welches in der äußeren Membran (OM) lokalisiert ist, löst sich das Fim-Protein aus dem Komplex und wird in die Fimbrie eingebaut. An den Spitzen der 0.1-2 μm langen und ungefähr 7 nm dicken Fimbrien befindet sich das Lektin FimH, welches α -D-Mannoside erkennen und binden kann und somit für die bakterielle Adhäsion der Bakterien an die Glycokalyx entscheidend ist. Das Lektin ist aus insgesamt 279 Aminosäuren aufgebaut und hat eine Masse von 29 kDa. Es besteht aus zwei Domänen, der *N*-terminalen Lektin-Domäne FimH_L (AS 1-156), welche die CRD enthält und der *C*-terminalen Pilindomäne (AS 160-279) FimH_P, welche die adhäsive Einheit in den Pilus verankert. Lektine mit zwei Domänen sind in Lösung nur stabil, wenn die *C*-terminale Pilus-Domäne mit Proteinen abgesättigt ist. Daher konnte die Struktur von FimH erst 1999^[21] gelöst werden, als es im Komplex mit dem *chaperone*-Protein FimC kristallisiert wurde. Durch die Kristallisation von

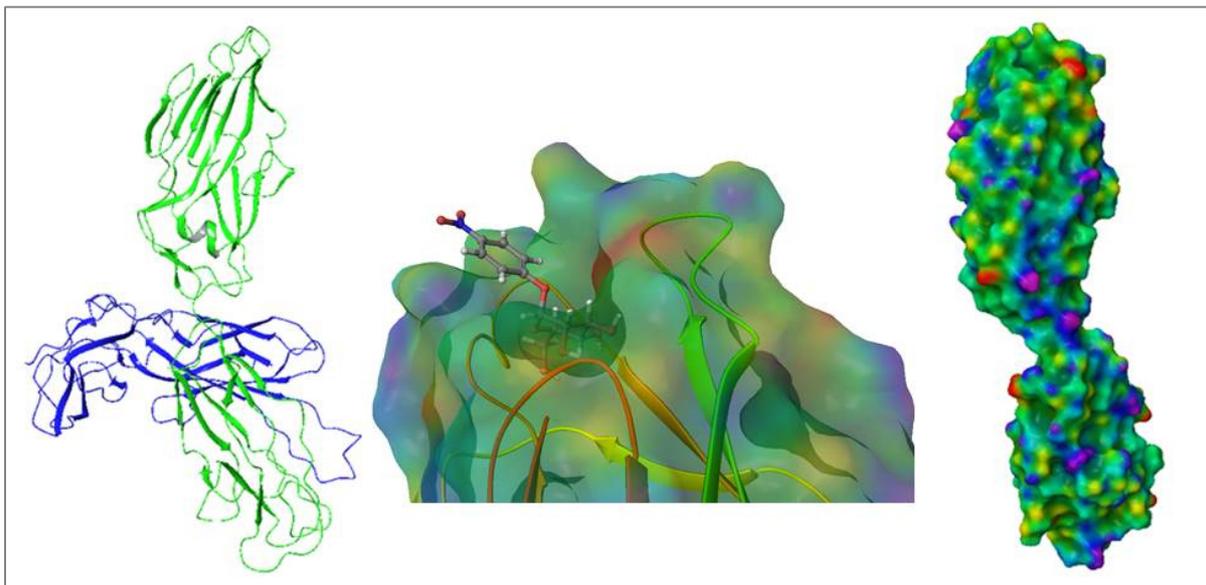


Abb. 4: Kristallstruktur von FimH. Links: Ribbon-Darstellung des kristallisierten FimH, welches durch die Komplexierung mit FimC stabilisiert ist. Mitte: FimH-Bindungstasche im Komplex mit *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid. Rechts: Connolly-Darstellung^[22] des FimH ohne FimC; am oberen Ende der Struktur ist die Bindungstasche (CRD) zu sehen. Die Bilder wurden mit *Maestro*^[23] aus dem Schrödinger-Programmpaket erstellt.

Lektinen zusammen mit ihren Liganden kann ein Einblick in die molekularen Details der Kohlenhydrat-Erkennung geschehen.^[24] Mit Hilfe von Kristallstrukturen können Wasserstoffbrückenbindungen sowie einzelne Wassermoleküle oder Ionen, die an dem Bindungsprozess beteiligt sind, genauestens untersucht werden. Aus der Struktur des FimH wird deutlich, dass sich α -D-Mannosylliganden gut in die CRD einfügen. In der tiefen und negativ geladenen Bindungstasche bildet die Mannose mit ihren Hydroxygruppen insgesamt

neun Wasserstoffbrückenbindungen mit den hydrophilen Aminosäuren sowie einem Wassermolekül innerhalb der CRD aus. Insbesondere sind die Aminosäuren PHE1, ASP47, ASP54, GLN133, ASN135 und ASN140 an der Komplexierung beteiligt. Ein α -orientiertes Aglycon am Kohlenhydratliganden ragt aus der Bindungstasche heraus und kann seinerseits durch zusätzliche Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche die Bindungsaffinität zum Teil erheblich steigern.

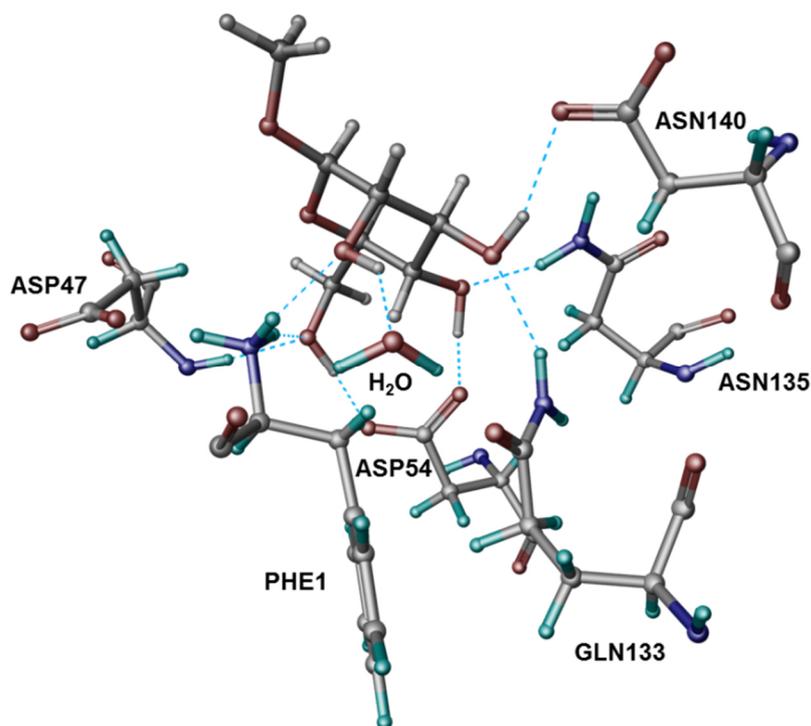


Abb. 5: Darstellung der Komplexierung von Methyl- α -D-mannopyranosid in der FimH-Bindungstasche. Das Saccharid bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu sechs verschiedenen Aminosäuren in der Bindungstasche sowie auch zu einem Wassermolekül aus, welches sich tief in der Bindungstasche befindet. Das Bild wurde mit *Maestro*^[23] aus dem Schrödinger-Programmpaket erstellt.

Insbesondere hydrophobe Wechselwirkungen des Aglycons mit den beiden aromatischen Seitenketten der Aminosäuren TYR48 und TYR137 stärken die Bindung des Liganden in hohem Maß. Vergleicht man beispielsweise die Dissoziationskonstanten von α -D-Mannose ($K_D = 2.3 \mu\text{M}$) und *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid ($K_D = 44 \text{ nM}$) ergibt sich für den Liganden mit aromatischem Aglycon eine um den Faktor 1000 verbesserte Affinität. Die beiden Tyrosinreste flankieren den Eingangsbereich der CRD, weshalb man in diesem Zusammenhang von einem Tyrosin-Tor spricht (Abb. 6). Zwei verschiedene FimH-Kristallstrukturen machen die Dynamik des Tyrosin-Tors deutlich. Diese Aminosäuren-Seitenketten sind flexibel, sie

stehen in der einen Struktur weit voneinander entfernt und in der anderen zueinander gewandt. Entsprechend wird von einem offenen bzw. geschlossenen Tyrosin-Tor gesprochen^[17] (im Folgenden als *open gate* und *closed gate* bezeichnet).

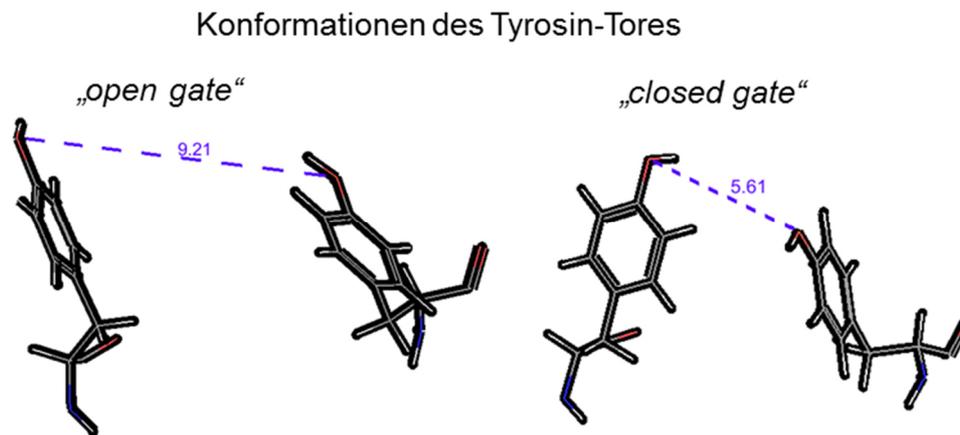


Abb. 6: Aus den Kristallstrukturen von FimH sind zwei Konformationen für die Tyrosinreste TYR48 und TYR137 bekannt. In der Kristallstruktur mit dem PDB-Code 1KLF^[25] stehen die beiden Aminosäuren in einem Abstand von 9.21 Å voneinander entfernt, wohingegen sie in der Kristallstruktur mit dem PDB-Code 1UWF^[26] mit 5.61 Å Abstand dichter zusammen stehen. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer *open gate*- bzw. *closed gate*-Kristallstruktur. Das Bild wurde mit *Maestro*^[23] aus dem Schrödinger-Programmpaket erstellt.

In Abb. 7 sind die Aminosäuren benannt, die den Eingangsbereich der CRD bilden. Auffällig ist ihre ausgeprägte Lipophilie; der sogenannte „hydrophobe Grat“, der von den Aminosäuren ILE13, ILE52, PHE142 zusammen mit den Tyrosinresten TYR48 und TYR137 gebildet wird. Dieser „zwingt“ den Kohlenhydrat-Liganden in eine Konformation, welche die polaren Interaktionen mit den dagegen hydrophilen Aminosäuren in der Bindungstasche vereinfachen. Kristallstrukturen liefern wertvolle Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand, können aber über die Dynamik des Bindungsvorgangs in wässriger Lösung, insbesondere über das Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation wenig Aufschluss geben. Die Untersuchung der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen in Lösung könnte daher noch zusätzliche Informationen über den Bindungsprozess bereithalten, welche durch die Kristallisation verborgen bleiben. Deshalb ist es für das vollumfassende Verständnis dieser molekularen Wechselwirkungen wichtig, Methoden zu entwickeln, die es erlauben, die Dynamik von Protein-Ligand-Wechselwirkungen in Lösung zu untersuchen. In diesem Zusammenhang spielt die Modifizierung von Proteinen eine wichtige Rolle.

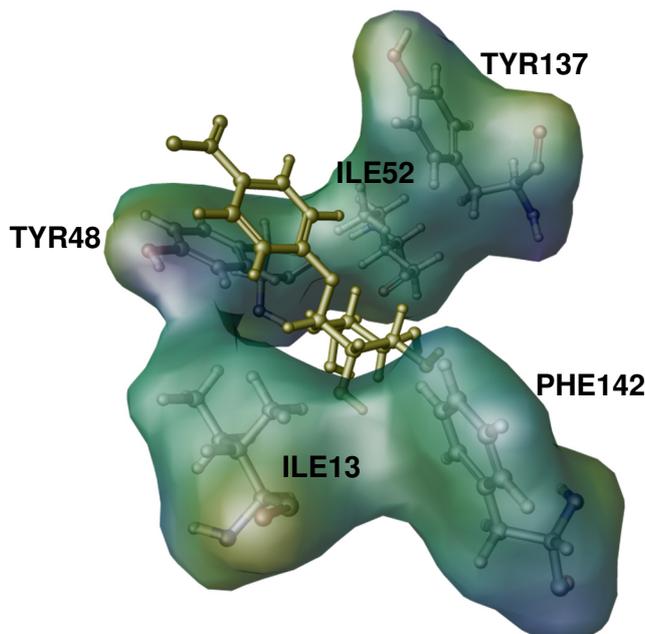


Abb. 7: Ausschnitt von FimH im Komplex mit *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid. Der „hydrophobe Grat“ bestehend aus den Aminosäuren ILE13, TYR48, ILE52, TYR137 und PHE142 zwingt den Kohlenhydratliganden in die bindende Position. Der dargestellte Ligand trägt im Aglycon einen aromatischen Rest, welcher durch die Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen mit den Tyrosinresten die Bindung verstärkt. Das Bild wurde mit *Maestro*^[23] aus dem Schrödinger-Programmpaket erstellt.

1.3 Methoden zur selektiven Proteinmodifizierung

Proteinmodifizierungen^[27-31] sind ein wertvolles Werkzeug in der Biologischen Chemie. Sie ermöglichen die Untersuchung und die Veränderung von Proteinfunktionen. Das dabei erlangte Verständnis und die Möglichkeit Proteinfunktionen zu kontrollieren bietet eine Vielzahl von Anwendungen in der Biologischen und der Medizinischen Chemie. In diesem Zusammenhang ist erforderlich, dass die Modifizierung durch synthetische Proben eine Selektivität in Bezug auf das adressierte Protein und die Markierungsposition hat und, dass die Anzahl der markierten Positionen kontrolliert werden kann. Sehr vereinfacht betrachtet sind Proteine gefaltete Makromoleküle, die eine Vielzahl von nukleophilen Funktionen auf ihrer Oberfläche tragen. Von diesen natürlichen Aminosäureresten werden vor allem die Thiofunktion von Cystein- sowie die ϵ -Aminogruppe von Lysin-Bausteinen für eine Proteinmodifikation adressiert. Cystein kommt dabei relativ selten auf der Proteinoberfläche vor. Klassische Reaktionen für die Modifizierung von Cystein sind Alkylierungsreaktionen mit α -Halogenacetylverbindungen oder Michael-Akzeptoren (Abb. 8).

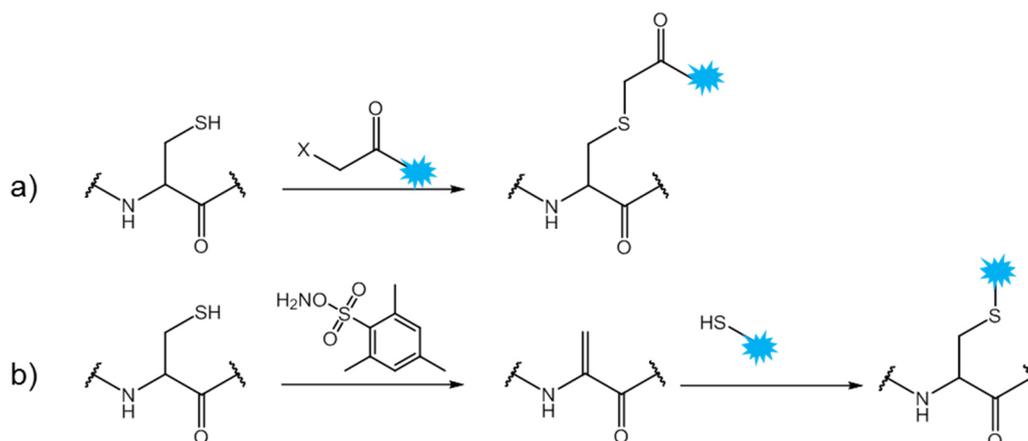


Abb. 8: Darstellung einer klassischen Methode und einer modernen Methode nach DAVIS^[32] für die Funktionalisierung von Cysteinseitenketten in einem endogenen Protein. a) klassische Alkylierungsreaktion von Cystein mit einer Halogencarbonylverbindung; b) moderne zweistufige Reaktion von Cystein: Zuerst reagiert Cystein mit *O*-Mesitylsulfonylhydroxylamin zum Dehydroalanin, anschließend folgt die Modifizierungsreaktion mit einem Thiol.

Die ϵ -Aminogruppe von Lysinseitenketten kann dagegen unter anderem mit aktivierten Estern, Sulfonylchloriden oder Isothiocyanaten reagieren. Inzwischen wurden neben diesen klassischen auch zahlreiche neue Methoden zur Modifikation von Cystein- und Lysin-Bausteinen entwickelt. Im Jahr 2008 publizierten DAVIS *et al.* eine Reaktion, die Cystein in zwei Schritten modifiziert.^[32] Dabei reagiert das Cystein zuerst mit *O*-Mesitylsulfonylhydroxylamin zum Dehydroalanin; dieses reaktive Zwischenprodukt kann nun weiter modifiziert werden, zum Beispiel in einer Michael-Reaktion mit Thiolen^[32] oder einer Olefin-Kreuzmetathese mit Allylsulfiden.^[33] Lysinseitenketten können, wie von FRANCIS und MCFARLAND berichtet, durch Iridium-katalysierte, reduktive Alkylierungsreaktionen funktionalisiert werden.^[34]

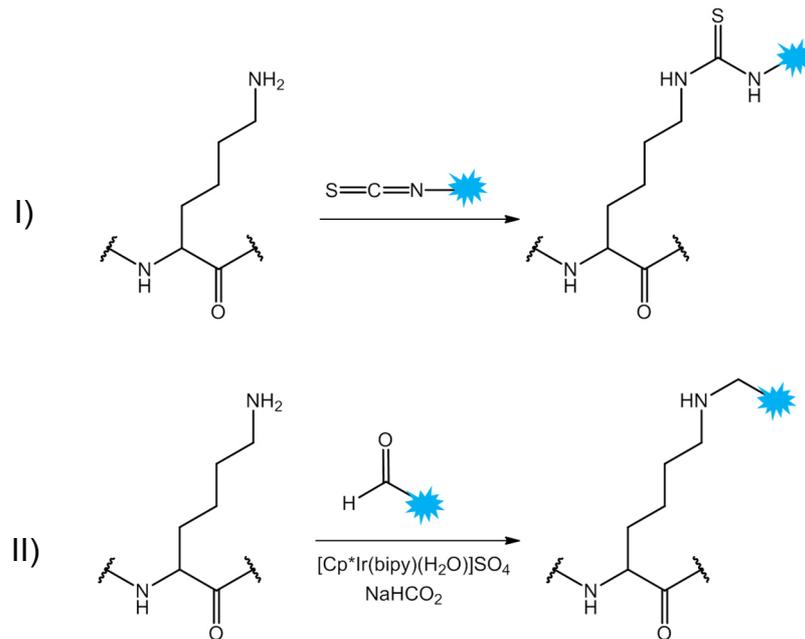


Abb. 9: Beispiele für Modifizierungsreaktionen von Lysin. I) Klassische Reaktion einer Aminofunktion mit Isothiocyanat,^[35] II) moderne Lysinmodifizierung nach FRANCIS^[34] durch eine Iridium-katalysierte, reduktive Alkylierungsreaktion.

BARBAS III *et al.*^[36] erweiterten die Möglichkeiten der zu adressierenden Aminosäuren durch die Entwicklung einer sehr spezifischen und effizienten Ligationsmethode für Tyrosinreste. Durch die Acidität des Wasserstoffatoms der Hydroxygruppe und der En-ähnlichen Struktur des Phenols können Diazocarboxamide das Tyrosin in einem der Click-Reaktion ähnlichen Reaktionsmechanismus in *ortho*-Position modifizieren (Abb. 10).

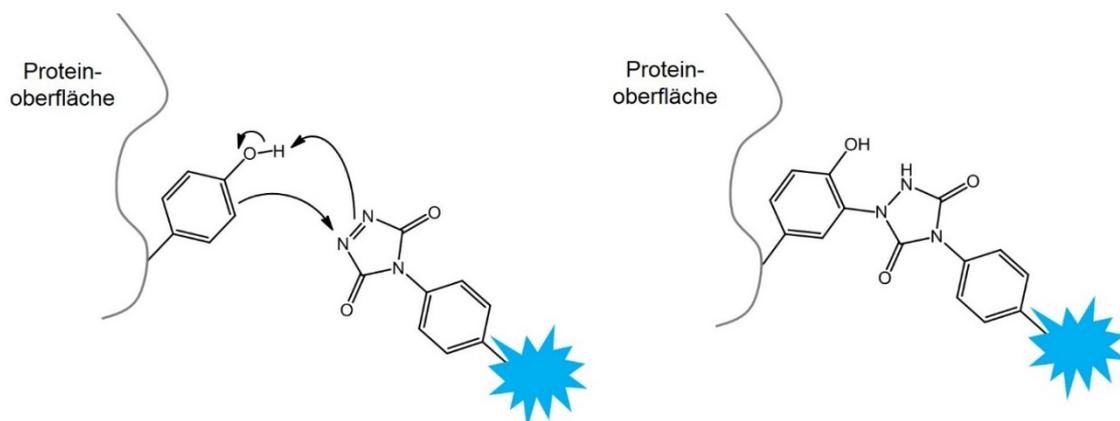


Abb. 10: Darstellung einer spezifischen Tyrosin-Ligationsreaktion (TLR) nach BARBAS III.^[36-37] Tyrosin reagiert in einem der En-Reaktion ähnlichen Mechanismus mit einem cyclischen Diazocarboxamid wie 4-Phenyl-3H-1,2,4-triazol-3,5(4H)-dion (PTAD). Nach der Rearomatisierung entsteht das in *ortho*-Position markierte Tyrosin-Kupplungsprodukt (rechts).

Trotz der Effizienz dieser Reaktionen ist ihre Anwendung begrenzt und nicht immer selektiv, besonders für die Anwendung in einem biologischen System. In diesem Zuge wurden eine ganze Reihe chemoselektiver Reaktionen für Biomoleküle entwickelt. Dabei wird eine unnatürliche Aminosäure, welche eine funktionelle Gruppe trägt, die eine chemoselektive Reaktion eingehen kann, selektiv in ein Protein eingebaut. In Abb. 11 sind einige unnatürliche Aminosäuren abgebildet, die für Proteinmodifizierungen verwendet werden. In den Seitenketten tragen sie bioorthogonale Gruppen wie Azide, Alkine, Halogenide oder Carbonylfunktionen, welche zum Beispiel durch eine Staudinger-Ligation,^[38] eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Reaktion^[39] oder eine Suzuki-Miyaura-Reaktion adressiert werden können.

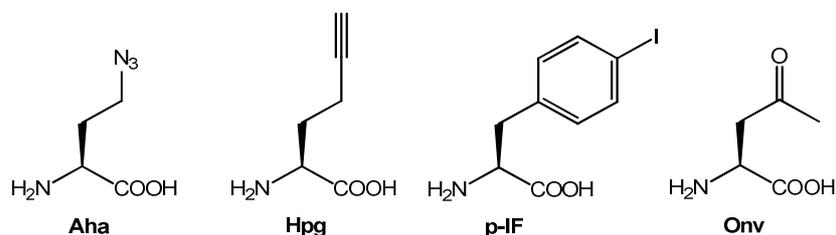


Abb. 11: Strukturformeln einiger unnatürlicher Aminosäuren, welche bioorthogonale funktionelle Gruppen tragen (Aha = Azido-homo-alanin, Hpg = Homo-propylglycin, *p*-IF = *p*-Iodphenylalanin, Onv = Oxonorvalin).

Alle diese Methoden erfordern eine genetische Manipulation der Proteine. Methoden, welche die Modifizierung eines endogenen Proteins ermöglichen sind näher an einem natürlichen, biologischen System und könnten für zukünftige medizinische Anwendungen interessant sein.^[40] Außerdem ist die Bandbreite der synthetischen Moleküle, die durch posttranslationale Methoden eingeführt werden können, größer. In den frühen 1960ern wurden erstmals affinitätsbasierte Methoden für die selektive Markierung endogener Zielproteine verwendet.^[41-43] Dabei trägt der spezifische Ligand die reaktive Gruppe, die das Protein markiert. Anfangs wurden in diesem Zusammenhang vor allem funktionelle Gruppen wie Diazirine, Phenylazide und Benzophenone für photoaktivierbare Derivatisierungen verwendet, deren chemische Struktur vielfach optimiert wurde.^[44] Aufgrund von oft zu geringen Ausbeuten,^[45] verursacht von der kurzen Lebenszeit der reaktiven Zwischenstufen, wurde aber immer wieder nach alternativen funktionellen Gruppen für die selektive Modifizierung von Proteinen gesucht, welche die Effizienz dieser ansonsten wertvollen Methode weiter erhöhen (Abb. 12).

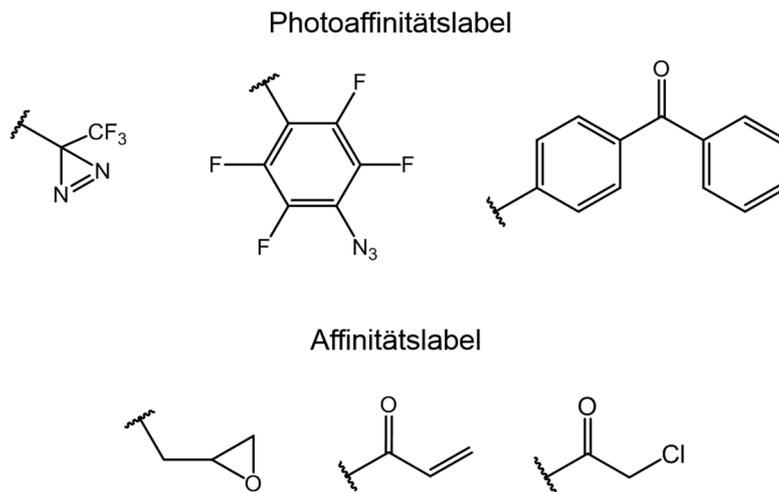


Abb. 12: Reaktive Gruppen für die (Photo)affinitäts-basierte Markierungsmethode von Proteinen.

SAMES *et al.*^[46] führten in diesem Zusammenhang ein neues Reagenz für die affinitätsbasierte Markierung ein. Eine Epoxidfunktion vereint die benötigte Stabilität und Reaktivität in der Proteinumgebung für eine erfolgreiche Markierung. Durch die Verbindung der reaktiven Gruppen mit den Liganden ist die Markierung selektiv, jedoch wird durch die Fixierung des Liganden an der Proteinoberfläche nach erfolgter Markierungsreaktion die Funktion des Zielproteins meist inaktiviert. Dadurch sind einige Anwendungen wie die Echtzeit-Untersuchung von Proteinaktivitäten limitiert. HAMACHI *et al.* haben diesen Punkt aufgegriffen und einige spurlose Markierungsreaktionen^[47] für Proteine entwickelt, welche die Proteinfunktion nach der Modifizierung nicht beeinträchtigen. Diese Reaktionen können generell in zwei unterschiedliche Typen eingeteilt werden (Abb. 13). Bei Reaktionen vom Typ-I ist der Ligand mit einer sogenannten Sollbruchstelle ausgestattet. Durch eine Austausch- oder Spaltungsreaktion kann eine beliebige Verbindung an das Protein gebunden werden, woraufhin der Ligand wieder freigesetzt wird. Bei Reaktionen vom Typ-II dagegen kommt ein Organokatalysator in Form eines Liganden zum Einsatz, der das funktionale Molekül, welches das Protein modifizieren soll, zunächst durch die Ausbildung eines hochreaktiven Intermediats aktiviert. Anschließend ist das Protein kovalent markiert und der Ligand wird freigesetzt.

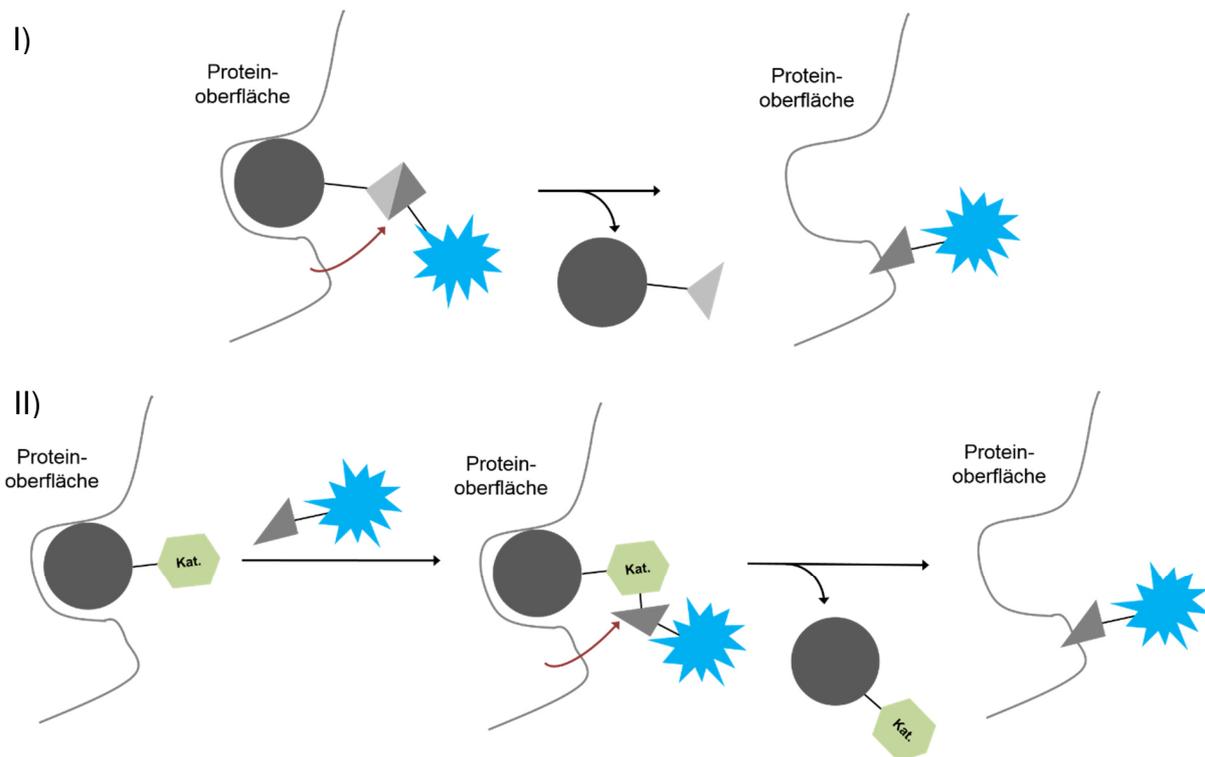


Abb. 13: Spurlöse Affinitätsmarkierungen. I) Markierung durch Austausch- oder Spaltungsreaktion; II) Markierung durch organokatalysierte Ligation.

Zunächst wurden Liganden mit Sollbruchstellen wie Disulfid- oder Hydrazonlinkern versehen. Aufgrund fehlender Bioorthogonalität der Spaltungsreaktionen wurde der Gedanke weiterentwickelt und schließlich die Ligand-gesteuerte „Tosyl“-Chemie (LDT-Chemie)^[48-49] eingeführt (Abb. 14). Die sogenannte „Tosyl“-Gruppe, die eigentlich ein Phenylsulfonatlinker ist, fungiert in dieser Methode sowohl als Linker zwischen dem Liganden und dem Molekül, welches an das Protein gebunden werden soll, als auch als reaktive Gruppe, welche die Konjugation ermöglicht. Der Phenylsulfonatrest wird in einer S_N2 -Reaktion von einem nukleophilen Aminosäurerest der Proteinoberfläche angegriffen, wodurch das Molekül gebunden und der Ligand freigesetzt wird. Diese Methode eignet sich für eine Vielzahl endogener Proteine und ist auch im zellulären Kontext zumeist anwendbar. Eine alternative Methode ist die Ligand-gesteuerte Acylimidazol (LDAI)-Chemie,^[50] mit deren Verwendung es gelang einen Folsäurerezeptor auf einer Zelloberfläche zu markieren. In diesem speziellen Fall erwies sich die LDT-Methode als nicht effizient genug.

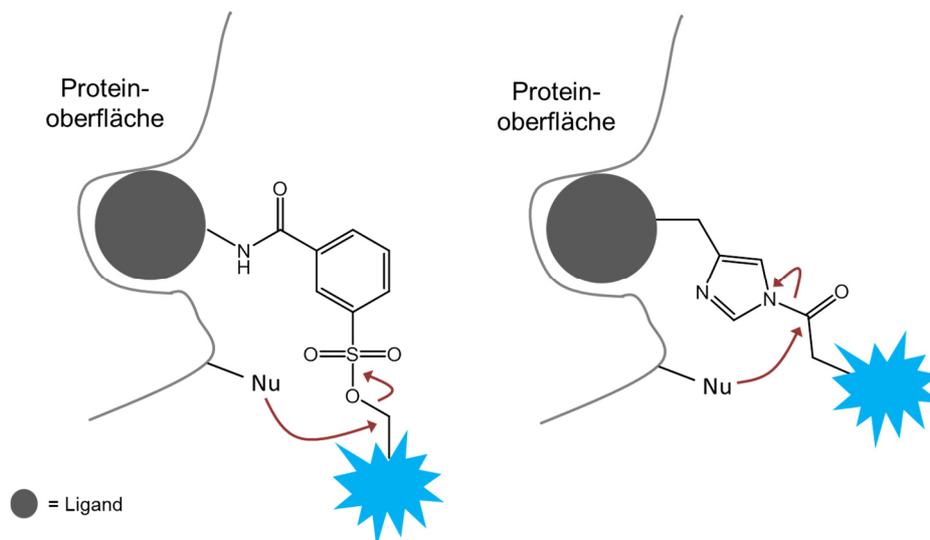


Abb. 14: Prinzipien der Ligand-gesteuerten „Tosyl“(LDT)- und Acylimidazol (LDAI)-Chemie. Der in der Bindungstasche gebundene Ligand wird durch einen nukleophilen Angriff eines Aminosäurerestes von der Proteinoberfläche gespalten. Die Probe wird kovalent an das Protein gebunden und der Ligand wieder freigesetzt.

Diesen Methoden verwandt ist ein weiterer Ansatz von HAMACHI *et al.*^[51], bei dem die Verwendung eines Organokatalysators, gebunden an einen Liganden, die Markierungsreaktion initiiert. 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) ist ein bekannter Acyltransfer-Katalysator in der organischen Synthese. Die Arbeitsgruppe entwickelte sogenannte affinitätsgesteuerte DMAP-Katalysatoren, bestehend aus einer DMAP-Teilstruktur und einem Liganden, welcher selektiv an das Zielprotein bindet.

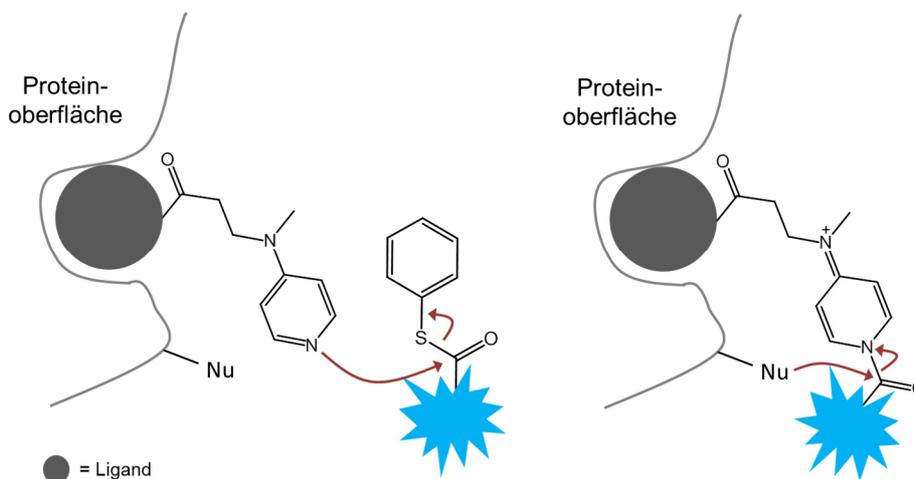


Abb. 15: Die Methode der DMAP-katalysierten Markierungsreaktion funktioniert in zwei Schritten. Der Affinitätskatalysator wird in der Bindungstasche vorpositioniert. Dort reagiert dieser mit einem Thioester und aktiviert diesen somit für die Acyltransferreaktion mit einem proteinogenen nukleophilen Aminosäurerest.

Somit wird die Acyltransferreaktion eines Thioester-funktionalisierten Moleküls in der Nähe der Bindungstasche des Proteins vereinfacht (Abb. 15). Den Erfolg dieser Methode demonstrierten HAMACHI *et al.* mit einer Vielzahl von Lektinen wie Congerin II (ConII), Concavalin A (ConA) und Weizenkeim-Agglutinin (WGA).^[52]

Das Thema der spurlosen Proteinmodifizierung wurde auch bereits von anderen Arbeitsgruppen aufgenommen, die weitere Organokatalysatoren entwickelten. KUNISHIMA *et al.* beispielsweise benutzten einen Biotin-gebundenen Chlortriazinrest, um Avidin zu markieren.^[53] Die rasante Entwicklung dieses Forschungsbereich in den letzten Jahren führte zu hocheffizienten Methoden für die Markierung und Modifizierung von endogenen Proteinen mit synthetischen Molekülen im Laborversuch sowie im zellulären Kontext. Sie können dabei helfen, Proteinfunktionen aufzuklären, zu kontrollieren und zu verändern. Neben der reinen Forschungserkenntnis könnten sie auch den Weg für eine Reihe medizinischer Anwendungen freimachen.

2 Projektidee

Die Methodenentwicklung in der Biologischen Chemie gestaltete sich in den letzten Jahren rasant. So hat die Forschung eine Reihe von Techniken hervorgebracht, welche die gezielte Markierung und Modifizierung von Proteinen ermöglichen (Kapitel 1.4). Damit lassen sich Proteinfunktionen aufklären und auf molekularer Ebene in einem dynamischen System untersuchen. Des Weiteren können Proteinfunktionen in vielfacher Weise manipuliert werden. Das bedeutet, neben dem reinen Erkenntnisgewinn wird der Weg bis hin zur Kontrolle biologischer Prozesse geebnet.^[54-56]

Bakterielle Infektionen stellen immer noch ein globales gesundheitliches Problem dar. Antibiotika nützen aufgrund der Entwicklung multiresistenter Keime immer weniger. Ein Strategiewechsel in der Wirkstoffentwicklung ist daher dringend notwendig; dieser könnte im Zusammenhang mit der Kontrolle bakterieller Adhäsion stehen.^[56] Adhäsive Organellen, welche an der bakteriellen Zellwand verankert sind, verhelfen Bakterien zur Adhäsion an die glycosylierte Zelloberfläche, was je nach Bakterienspezies und Ort der Adhäsion zum Nutzen oder Schaden für den Organismus sein kann. Diese als Fimbrien bezeichneten Organellen enthalten Lektindomänen, welche, aufgrund ihrer Fähigkeit spezifische Kohlenhydrate binden zu können, eine Voraussetzung für die Adhäsion der Bakterien schaffen. Im Fall von *E. coli*-Bakterien fällt der Blick besonders auf das Lektin FimH, welches an der Spitze der Typ-1-Fimbrien lokalisiert ist und spezifisch an α -D-Mannosylreste binden kann.^[17] Informationen über die Bindungstasche und den Bindungsmechanismus der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung wurden für dieses System bisher vor allem durch Röntgenstrukturen erhalten. Jedoch schließt der Kristallisationsprozess molekulare Dynamik in Lösung aus. Eine Betrachtung der herrschenden Wechselwirkungen in einem natürlichen, dynamischen System könnte die bisher erhaltenen Informationen in entscheidenden Punkten ergänzen.

In diesem Zusammenhang stehen in der vorliegenden Arbeit zwei Forschungsziele im Vordergrund. Zum einen soll die Bindungstasche des Lektins FimH markiert werden, um den bisher aus Röntgenstrukturen erhaltenen Erkenntnissen über FimH-Bindungsstellen weitere Details der FimH-Kohlenhydrat-Bindung hinzuzufügen. Zum anderen gilt es, FimH gezielt an der Bindungstasche unter Anbringung eines Photoschalters zu modifizieren. Ist das Schaltermolekül an der Bindungstasche befestigt, ist es möglich, die FimH-Funktion, also die Bindung weiterer Mannoside, photochemisch zu kontrollieren, indem der Eingang der Bindungstasche sterisch blockiert bzw. geöffnet wird. Übertragen auf die Bakterienzelle soll es

mit diesem Konzept letztendlich möglich sein, bakterielle Adhäsion wie die von *E. coli* an die Glycokalyx einer Zielzelle oder an eine Oberfläche gezielt an- und auszuschalten. Drei verschiedene Methoden wurden für die skizzierten Forschungsziele herangezogen: zwei unterschiedliche affinitätsgesteuerte und eine ligandgesteuerte Markierungsreaktion (Abb. 16).

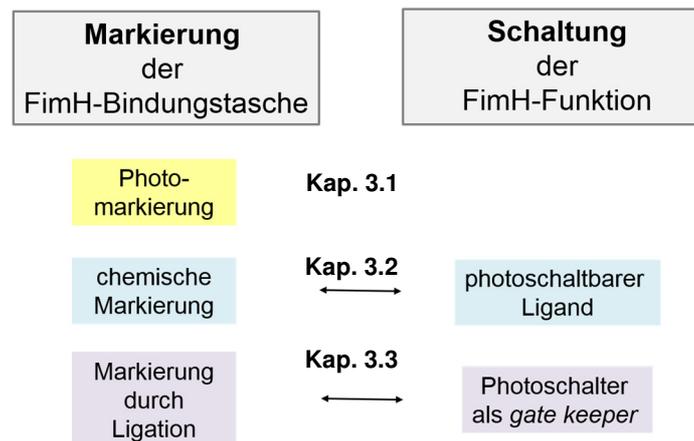


Abb 16: Zwei Forschungsziele stehen im Fokus dieser Arbeit, welche in drei Teilprojekten bearbeitet wurden: die Markierung der FimH-Bindungstasche sowie die Schaltung der FimH-Funktion.

Für die photoaffinitätsgesteuerte Markierung wird ein passender Ligand mit einer photolabilen Gruppe versehen und zunächst mit dem Zielprotein inkubiert. Durch Bestrahlung des reversiblen Ligand-Rezeptor-Komplexes wird die photolabile Gruppe unter Ausbildung eines hochreaktiven Intermediats, z.B. in Form eines Carbens oder Nitrens, aktiviert. In einer Insertionsreaktion kann das reaktive Intermediat eine kovalente Bindung zu der Proteinoberfläche in Nähe der Bindungsstelle ausbilden (Abb.17). Durch den enzymatischen Verdau des markierten Proteins und anschließende massenspektrometrische Untersuchung lassen sich so alle Kohlenhydrat-Bindungsstellen identifizieren und in den Kontext der Kohlenhydrat-Komplexierung stellen.

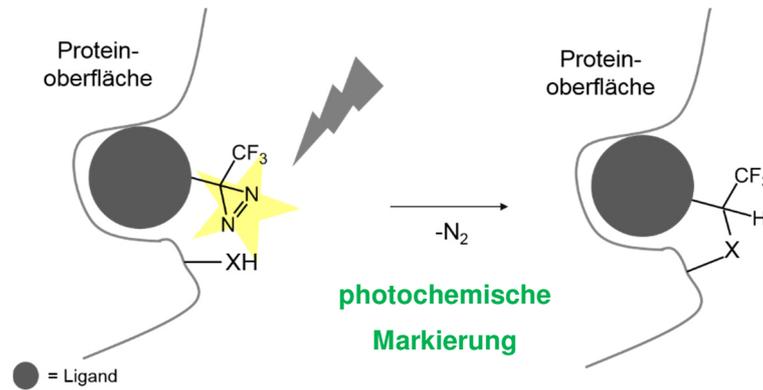


Abb. 17: Photomarkierung der FimH-Bindungstasche.

Die Methode der Photoaffinitätsmarkierung ist seit langem in der Literatur^[57-58] und im Arbeitskreis LINDHORST^[59-61] etabliert. So wurden bereits in der Vergangenheit photolabile Liganden für FimH dargestellt. In der Disputationsschrift von MÄRTEN^[60, 62] wurde die Markierungseffizienz verschiedener photolabiler Gruppen mit FimH getestet. Dabei zeigte sich besonders das Diazirin als sehr vielversprechend, so dass auch in der vorliegenden Arbeit mit Diazirinen gearbeitet wurde. Die Bindung an das FimH gelang MÄRTEN *et al.* bereits, allerdings konnte das markierte Protein nicht näher analysiert werden. Probleme ergaben sich vor allem durch die geringe Ausbeute der Markierungsreaktion. Durch die Verbesserung der bisher verwendeten FimH-Liganden in Hinblick auf ihre Affinität zur Bindungstasche soll die Photomarkierung des FimH optimiert und zum Erfolg geführt werden. Dazu wird vor allem das Design der Liganden vor der Synthese mit Hilfe von Computer-gestützten Docking-Studien perfektioniert. Auch die Verwendung mehrerer photolabiler Funktionen innerhalb eines Liganden zur Steigerung der Ausbeute gilt es hierbei zu betrachten. Nach der Optimierung am Computer und der Synthese ist die Bestrebung weiterhin die Markierungsreaktion mit Hilfe der dargestellten photolabilen Liganden an FimH zu testen und schließlich zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Neben dem Ziel der Markierung der FimH-Bindungstasche steht für das zweite und dritte Teilprojekt dieser Arbeit auch die photochemische Kontrolle der Kohlenhydrat-Lektin-Bindung im Fokus. Die Realisierung dieser Forschungsziele wird dabei allerdings in zwei unterschiedlichen Konzepten angegangen (Abb. 18), die im Folgenden beschrieben werden.

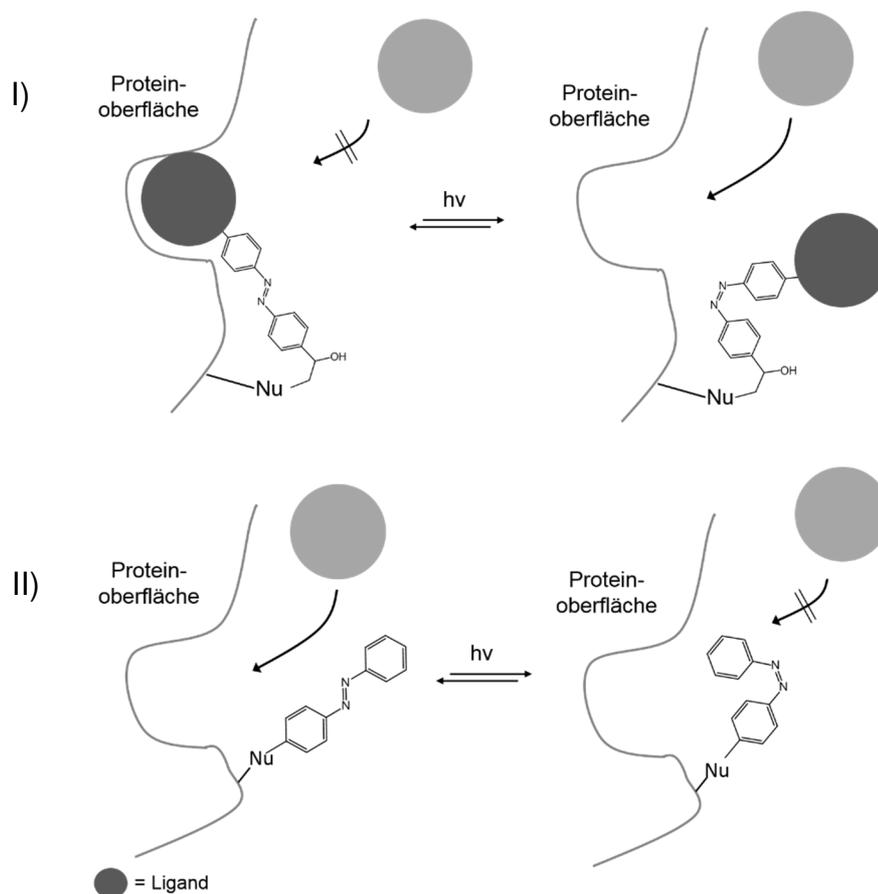


Abb. 18: Vergleich der beiden unterschiedlichen Ansätze zur photochemischen Kontrolle der FimH-Funktion. I) Verwendung eines photoschaltbaren FimH-Liganden; II) Installation einer photoschaltbaren Einheit als *gate keeper* am Eingang der Bindungstasche.

Im zweiten Teilprojekt wird als Alternative zur Photomarkierung ein neues Konzept zur Markierung der FimH-Bindungstasche verfolgt, das auf bekannte affinitätsgesteuerte Methoden zurückgreift. In der Literatur hat bereits ein langsamer Wandel von den photolabilen Gruppen hin zu weniger reaktiven Funktionen begonnen, mit dem Ziel die Effizienz der Markierungsreaktion zu erhöhen.^[28] SAMES *et al.*^[46] verwendeten erstmals Epoxide für die Markierung von Proteinen, die im Gegensatz zu den reaktiven Intermediaten der photolabilen Gruppen eine erhöhte Stabilität in einer wässrigen Umgebung mit dem Protein zeigten. Daraus ergab sich für das FimH die Ambition, Mannosidliganden mit einer Epoxid-Funktionalität im Aglycon zu entwerfen. Eine affinitätsgesteuerte Markierung in dieser Art ging bisher immer mit einer Inaktivierung der Proteinfunktion einher. Daher sollte das Ligandmolekül nach dem Vorbild der Arbeiten von TRAUNER *et al.*^[63] neben der reaktiven Gruppe außerdem eine photoschaltbare Einheit enthalten. Nach der Markierung des Proteins wäre es damit möglich, die Aktivierung bzw. die Inaktivierung der Proteinfunktion photochemisch zu steuern. Die

konformationelle Änderung des Photoschalters, welche durch die Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge gelingt, entfernt den komplexierten Liganden reversibel aus der Bindungstasche.

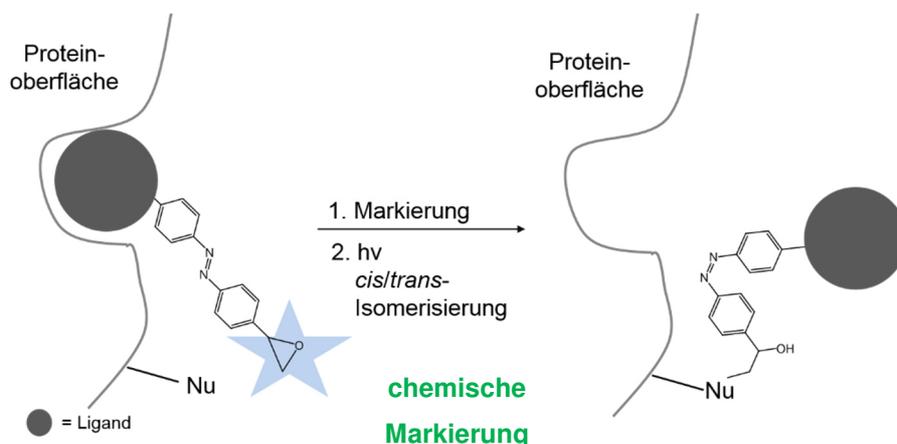


Abb. 19: Chemische Markierung der FimH-Bindungstasche mit Hilfe von Epoxiden. Anschließend wird der Ligand durch *trans/cis*-Isomerisierung reversibel aus der Bindungstasche entfernt.

Für die Realisierung dieser Projektidee galt es, trifunktionelle Moleküle zu entwerfen, die aus einer Mannosideinheit und einer Epoxidfunktion zusammengesetzt sind, verbrückt über eine photoschaltbare Azobenzoleinheit. Diese funktionalisierten Glycoazobenzole sind dazu in der Lage, das FimH in der planaren (*trans*-) Form zu markieren, wobei die Ligandeneinheit in der Bindungstasche fixiert ist. Durch Schaltung der Azobenzoleinheit in die gestauchte (*cis*-) Form, wird das Mannosid aus der Bindungstasche herausgezogen. Neben der Synthese galt es, die Mannoside außerdem am Computer mit Hilfe von Docking-Studien auf ihre Affinität und ihr Markierungspotential hin eingehend zu testen, um damit ein optimiertes System für die Markierung der FimH-Bindungstasche zu entwickeln.

In dem dritten Teilprojekt wurde sich dem Ziel der photochemischen Kontrolle der FimH-Funktion in einer variierten Strategie unter Verwendung einer DMAP-vermittelten Ligationsreaktion genähert werden. Hierbei war die Idee, den Photoschalter für sich allein ohne den Liganden an die FimH-Bindungstasche zu fixieren und dort als eine Art *gate keeper* zu positionieren. Die von HAMACHI *et al.*^[51-52, 64-67] entwickelte DMAP-vermittelte Ligationsmethode erlaubt es, ein beliebiges funktionelles Molekül affinitätsgesteuert kovalent an der Protein-Bindungstasche zu installieren. Die Ligationsreaktion erfolgt in einem zweistufigen Mechanismus, wobei der Ligand als Organokatalysator die kovalente Bindungsbildung zur Proteinoberfläche lediglich initiiert und anschließend wieder aus dem

System entfernt werden kann. Somit bleibt die Bindungstasche nach der Modifikation des Proteins frei. In dem genauen Ablauf dieser Reaktion wird ein DMAP-funktionalisierter Ligand mit dem Protein inkubiert. Das funktionelle Molekül, das anschließend das Protein markieren soll, wird in Form eines Thioesters hinzugegeben. Der DMAP-Ligand reagiert mit dem Thioester und bildet einen Aktivester als reaktives Intermediat, welcher durch ein in der Nähe befindliches Nucleophil aus den Aminosäureseitenketten angegriffen werden kann unter Ausbildung einer kovalenten Bindung. Diese Methode wird dazu verwendet, eine photoschaltbare Azobenzoleinheit am Eingang der FimH-Bindungstasche zu fixieren und damit den Zugang zur Bindungsstelle gezielt photochemisch zu kontrollieren. Dem Konzept nach lässt das Azobenzolderivat in seiner *trans*-Konfiguration den Eingang frei für die Bindung von Mannosiden, wohingegen der Einlass durch die Schaltung des Photoschalters in die *cis*-Konfiguration sterisch blockiert ist (Abb. 20).

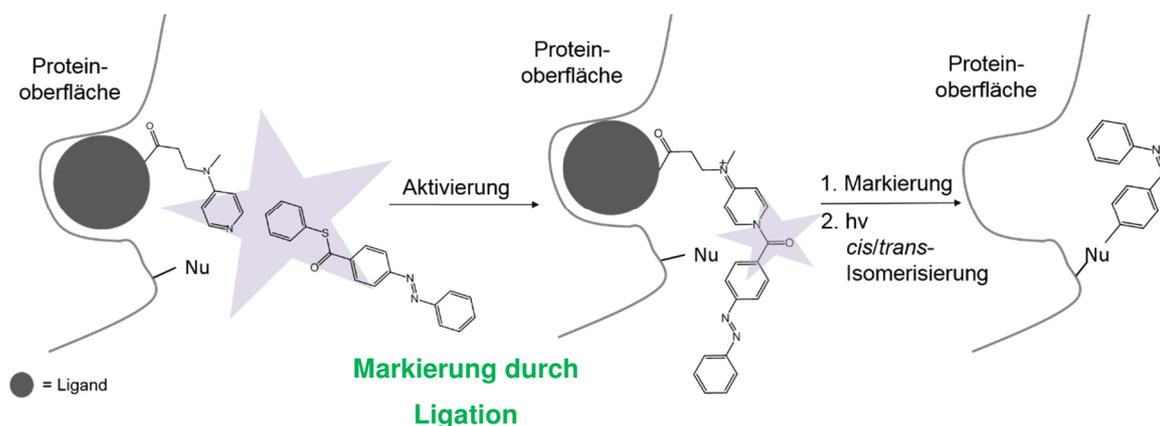


Abb. 20: DMAP-vermittelte Ligrationsreaktion zur Markierung der FimH-Bindungstasche.

Gelingt diese Modifizierung an dem isolierten Lektin FimH als auch an den Bakterienzellen, wird dadurch ermöglicht, die Fähigkeit der bakteriellen Adhäsion reversibel an- und auszuschalten und zwar sowohl zeitlich als auch ortsabhängig kontrolliert. Dieser Punkt ist besonders wichtig und für die Strategie der Entwicklung neuartiger Wirkstoffe von Bedeutung. Die bakterielle Adhäsion kann damit dort stattfinden, wo sie von Nutzen ist und wird verhindert, wo sie schadet. Für die Realisierung dieses Vorhabens werden verschiedene DMAP-funktionalisierte Mannosidliganden sowie eine Auswahl an verschiedenen Azobenzolthioestern mit variierten Eigenschaften bezüglich sterischer Ausdehnung oder Polarität entworfen und synthetisiert. Zusätzlich zu der synthetischen Arbeit ist das Ziel, die Markierung am Computer zu simulieren und in Hinblick auf den Erfolg der Schaltung bakterieller Adhäsion zu bewerten, um anschließend den Schritt hin in die Praxis zu gehen und das FimH in angedachter Weise zu modifizieren. Die massenspektrometrische Untersuchung

und Auswertung aller Markierungs- und Modifizierungsreaktionen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe THOLEY (Kiel) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Design, Synthese und Anwendung photolabiler Mannosidliganden zur Markierung der Bindungstasche des bakteriellen Lektins FimH

Die Aufklärung detaillierter Mechanismen in der Wechselwirkung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen auf molekularer Ebene ist essentiell für die Entwicklung von Wirkstoffen und für das Verständnis der bakteriellen Adhäsion. Die Photomarkierung^[45, 57-58, 68] ist in diesem Zusammenhang eine besonders geeignete Methode, weil sie eine Untersuchung der Wechselwirkungen in Lösung, das heißt in einer natürlichen Umgebung ermöglicht. Dabei wird ein Rezeptor mit einem passenden Liganden inkubiert, welcher eine photolabile Gruppe trägt. Der gebildete Rezeptor-Ligand-Komplex wird mit Licht einer geeigneten Wellenlänge bestrahlt, welche die photolabile Gruppe am Liganden aktiviert. Dabei bildet diese in einer Photoreaktion eine hochreaktive Zwischenstufe, welche eine kovalente Bindung zu einer Aminosäure der Proteinoberfläche in Nähe der Bindungsstelle ausbildet. Damit ist die Bindungstasche irreversibel markiert (Abb.21).

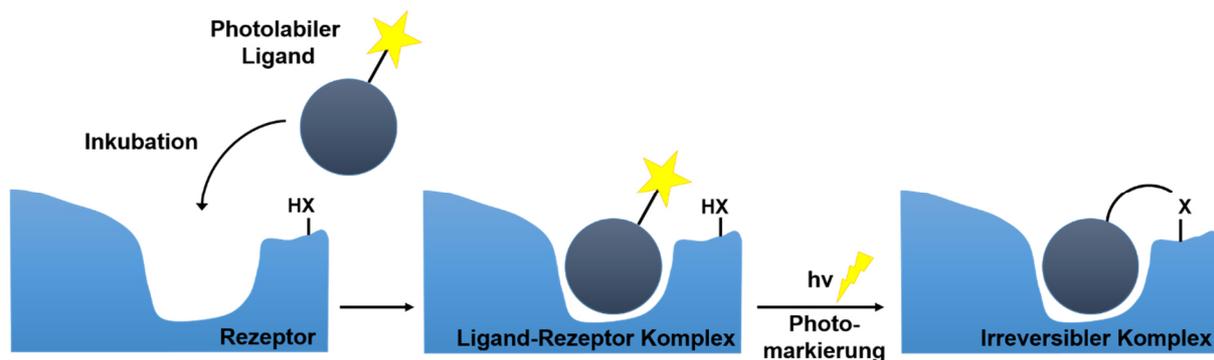


Abb. 21: Das Prinzip der Photomarkierung. Ein photolabiler Ligand wird mit einem passenden Rezeptor inkubiert. Im nächsten Schritt wird der Komplex bestrahlt, die photolabile Gruppe wird dadurch aktiviert und bildet eine kovalente Bindung zur Rezeptoroberfläche aus ($X = C, N, O$). Der Rezeptor ist anschließend irreversibel markiert.

Dabei ist ein wichtiger Punkt, dass der reversible Ligand-Rezeptor-Komplex vor der Markierungsreaktion möglichst langlebig sein muss, damit die spezifische Markierung der Bindungstasche gelingt. Ist das der Fall, ermöglicht diese Methode nun also einerseits unbekannte Bindungsstellen zu identifizieren und andererseits den Bindungsvorgang in einem natürlichen, dynamischen System zu analysieren. Dazu muss der Komplex massenspektrometrisch untersucht werden. Der markierte Proteinkomplex wird zunächst durch einen enzymatischen Verdau in Fragmente zerschnitten. Diese Fragmente, unter denen auch das

markierte Peptid ist, werden durch Tandem-Massenspektrometrie eingehend untersucht. Durch den Vergleich mit einem nicht markierten Protein lässt sich das modifizierte Fragment und somit der Ort der Markierung identifizieren (Abb. 22).

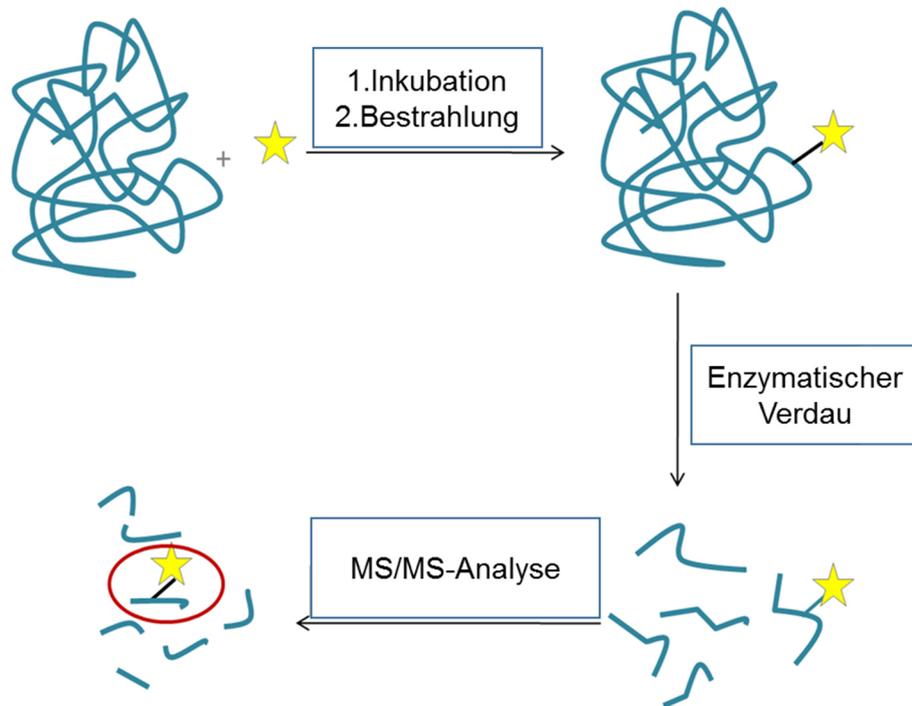


Abb. 22: Nach der erfolgreichen Markierung des Proteins mit Hilfe eines photolabilen Liganden kann die markierte Position durch MS-Analyse identifiziert werden. Dazu wird das Protein durch enzymatische Hydrolyse in definierte Fragmente zerschnitten. Die Fragmente werden durch MS/MS-Sequenzierung identifiziert. Durch das Fragmentierungsmuster und den Vergleich mit dem nicht markierten Protein kann die funktionelle Gruppe, mit der die kovalente Bindungsbildung stattgefunden hat, identifiziert werden.

In der Literatur finden vor allem die in Abb. 23 gezeigten photolabilen Gruppen Anwendung: Benzophenone, Arylazide und Diazirine. Jede von ihnen hat spezifische Eigenschaften. In dieser Arbeit wurde das Diazirin verwendet, welches nach Literaturlage am geeignetsten für die Markierung von FimH erscheint.^[45, 68] Zum einen sind Diazirine sterisch wenig anspruchsvoll, so dass die eigentliche Rezeptor-Ligand-Bindung nicht beeinträchtigt werden sollte; zum anderen ist die Wellenlänge, die für die Photoaktivierung von Diazirinen benötigt wird, für biologische Anwendungen geeignet. Diese Wellenlänge beschädigt oder verändert das Rezeptor-Protein in keiner Weise.

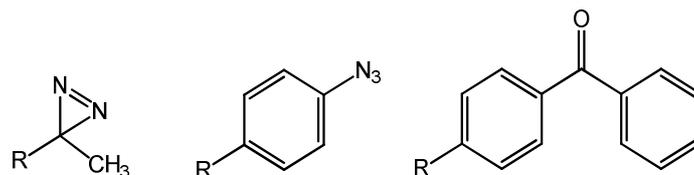


Abb. 23: Photolabile Gruppen für die Photoaffinitätsmarkierung: Diazirine, Arylazide und Benzophenone.^[69]

Diazirine wandeln sich nach einer Bestrahlung mit Licht bei Wellenlängen um 350 nm unter Stickstoff-Abspaltung in hochreaktive Carbene um. Diese haben eine sehr kurze Lebensdauer und können in nicht-aktivierte CH-, OH- oder auch NH-Bindungen insertieren und kovalente Kreuzkupplungsprodukte bilden (Abb. 24).

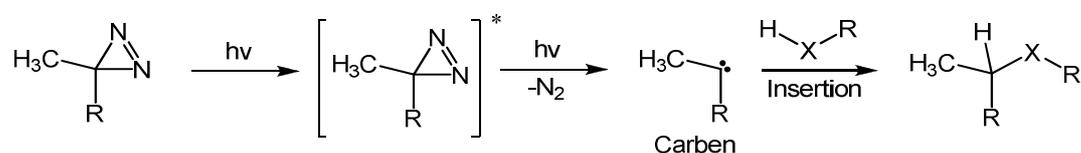


Abb. 24: Photoreaktion des Diazirin-Photophors mit anschließender Insertion in eine HX-Bindung (X = C, O, N).

In Bestrahlungsversuchen hat sich allerdings gezeigt, dass eine Insertion in OH-Bindungen favorisiert ist.^[68] In Konkurrenz zur Insertionsreaktion stehen ungewünschte Nebenreaktionen, die berücksichtigt werden müssen. So können Carbene auch an Doppelbindungen addieren oder es kommt durch Migration von α -H-Atomen zur Bildung von Alkenen (Abb. 25).

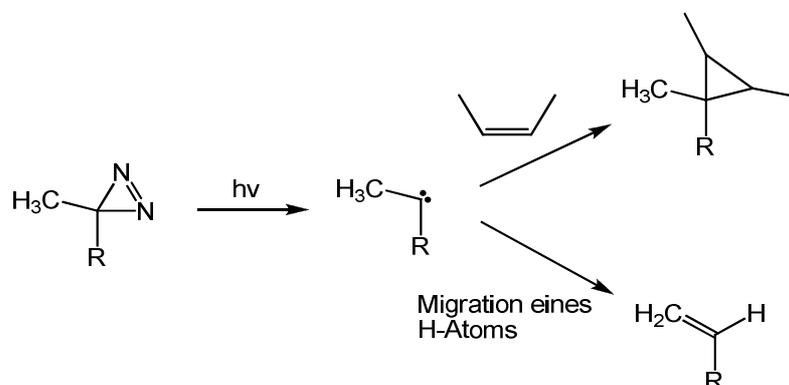


Abb. 25: Nebenreaktionen von Carbenen: Addition an Doppelbindungen und die Migration von α -H-Atomen unter Bildung von Alkenen.

Eine weitere im Zusammenhang der Photomarkierung unerwünschte Nebenreaktion stellt die Isomerisierung der Diazirine zu entsprechenden Diazo-Verbindungen dar, deren Reaktivität in Bezug auf die Carben-Bildung geringer ist (Abb. 26).^[45]

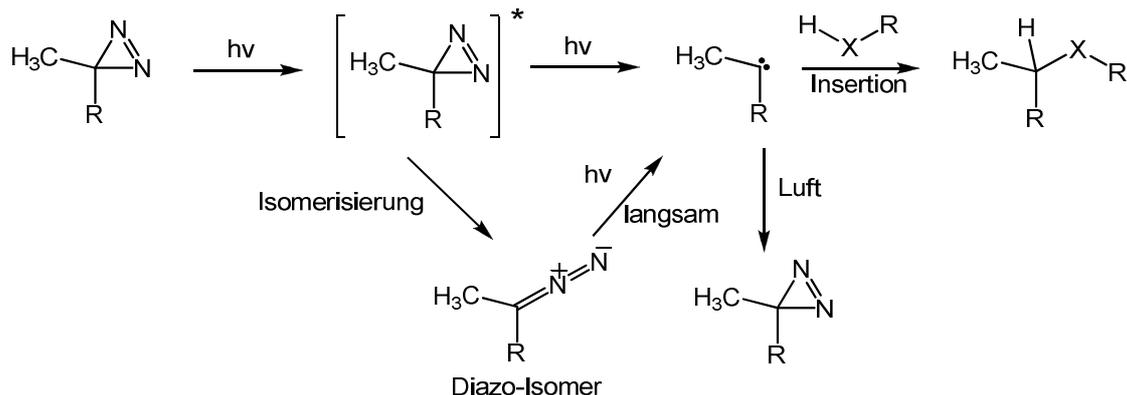


Abb. 26: Photoisomerisierungen eines Diazirins zum Diazo-Isomer stellen unerwünschte Nebenreaktionen dar, da sie die Reaktivität der photoaktiven Gruppe erniedrigen.

BRUNNER *et al.*^[70] entwickelten erstmals das Trifluormethylaryldiazirin (**1**),^[71-73] dessen Synthese später von HATANAKA *et al.*^[74] optimiert wurde. Bei diesem speziellen Diazirin sind unerwünschte Nebenreaktionen weitestgehend zurückgedrängt, so dass dessen Anwendung in der Photoaffinitätsmarkierung gut etabliert ist (Abb. 27). Die Diazirin-Funktion dieser Verbindung trägt keine α -H-Atome und die gebildeten Carbene bilden hauptsächlich Insertionsprodukte. Die Isomerisierung zur Diazo-Verbindung ist zusätzlich zurückgedrängt.

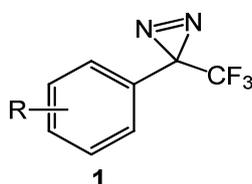


Abb. 27: BRUNNER *et al.*^[70] synthetisierten erstmals das Trifluormethylaryldiazirin (**1**), welches eine effizientere Verwendung der Diazirine in der Photomarkierung ermöglicht.

Durch den elektronenziehenden Effekt der Trifluormethyl-Gruppe des Diazirins **1** wird sowohl das Carben als auch das durch die Photoreaktion entstehende Diazo-Isomer stabilisiert. Im Fall des Carbens wird dadurch eine Umlagerungsreaktion verhindert. Die Diazo-Verbindung dagegen wird damit weitestgehend unreaktiv, so dass unspezifische Nebenreaktionen durch dessen langsamere Umwandlung zum Carben nicht auftreten. Die Reaktivität des Carbens, welches aus dem Diazirin **1** gebildet wird, ist demnach sehr hoch, weshalb die Markierungsreaktion äußerst spezifisch abläuft. Ist das erwartete Substrat nicht in unmittelbarer Umgebung, reagiert es allerdings auch mit allen in der Nähe befindlichen Reaktionspartnern wie beispielsweise auch dem Lösungsmittel. Das führt meist zu einer geringen Ausbeute des

gewünschten Insertionsprodukts. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von Trifluormethylaryldiazirinen besteht in ihrer Labilität gegenüber Tageslicht und Feuchtigkeit sowie in ihrer aufwendigen Synthese. Trotzdem ist das Diazirin aufgrund der äußerst kurzen Bestrahlungsdauer und seinen effizienten Photoreaktionen das vielversprechendste Photophor für die Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen.

3.1.1 Design der photolabilen Liganden - Docking Studien

Voraussetzung für die erfolgreiche Markierung der FimH-Bindungstasche ist es, Liganden für das Lektin zu entwerfen, die zum einen gut binden und zum anderen die sterische Voraussetzung für eine erfolgreiche Insertion der Diazirine in funktionale Bindungen der Proteinstruktur erfüllen. Eine hohe Affinität zur Kohlenhydrat-erkennenden Domäne ist besonders in Hinsicht auf die Ausbeute der folgenden Insertionsreaktion von großer Bedeutung. Je besser der Ligand bindet, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass dieser sich im Moment der Bestrahlung in der Bindungstasche befindet, so dass eine Nebenreaktion mit dem Lösungsmittel vermindert wird. Vier verschiedene photoaktivierbare FimH-Liganden wurden entworfen (**4-7**), deren Strukturen auf die gut bekannten FimH-Inhibitoren *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid **2** und Quadratsäuremannosid **3** zurückgehen (Abb. 28).^[75-76] Dabei wurden einfach (**4, 5**) und zweifach (**6, 7**) Diazirin-funktionalisierte Moleküle ausgewählt. Die Verwendung mehrerer Diazirin-Einheiten zielt dabei auf eine höhere Ausbeute der Proteinmarkierung. Um diese Strukturvorschläge zu optimieren, wurden Computer-gestützte Docking-Studien durchgeführt, die eine Einschätzung des Bindungsverhaltens auf der Grundlage verschiedenster Wechselwirkungstypen geben sollten. Von FimH-Liganden mit aromatischem Aglycon kann aufgrund möglicher Wechselwirkungen mit dem Tyrosin-Tor eine gesteigerte Affinität erwartet werden.^[17] Ein Ligand mit aromatischem Aglycon kann demnach durch die Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen fester binden. Eine weitere Steigerung der Affinität wurde in der Vergangenheit durch die Einführung eines Quadratsäurerestes erreicht.^[75]

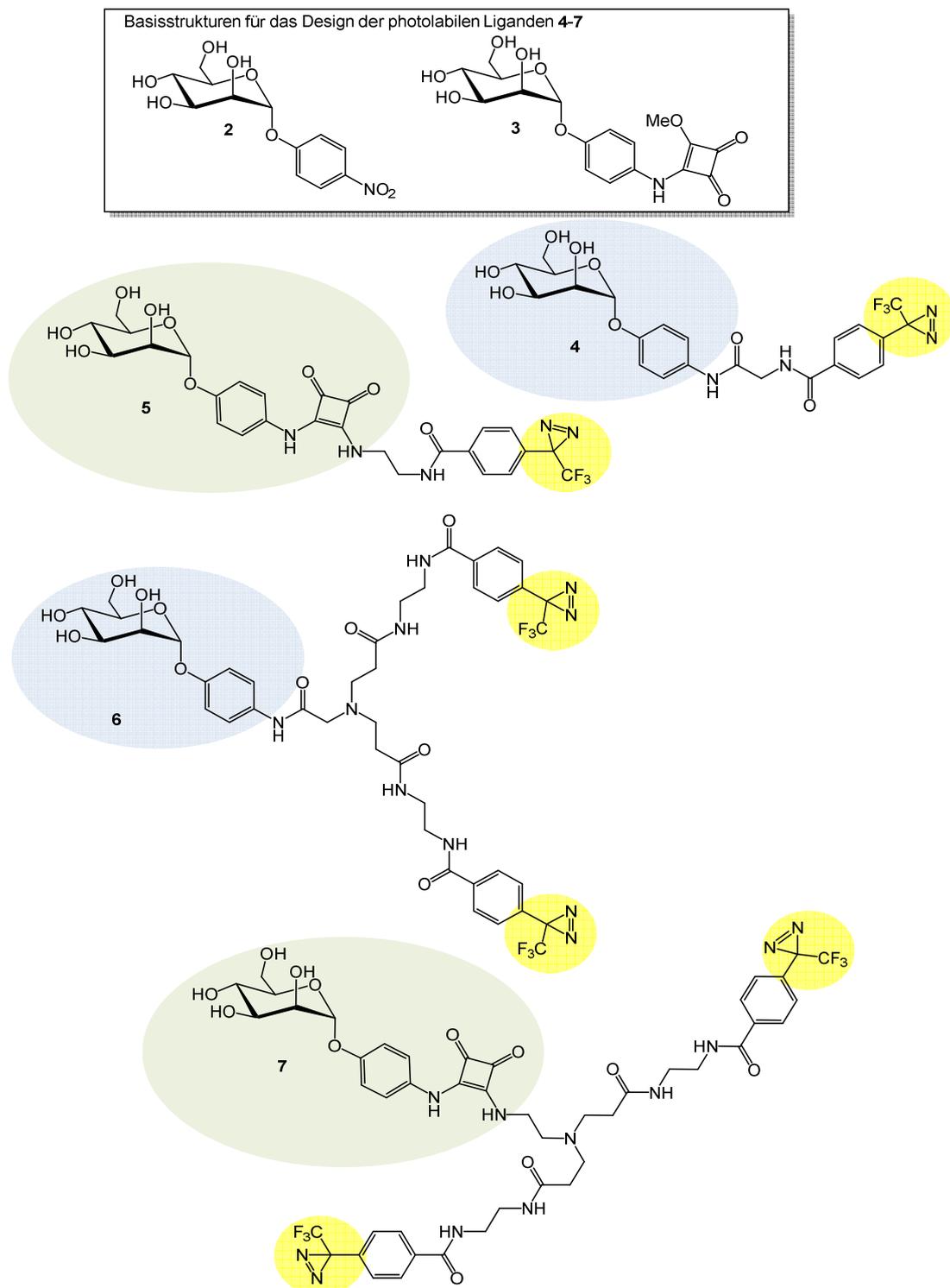


Abb. 28: Vier verschiedene mono- und bifunktionelle photolabile Liganden wurden für die Markierung des Lektins FimH entworfen. Als strukturelle Basis wurden die gut bekannten FimH-Inhibitoren *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid **2** und Quadratsäuremannosid **3** gewählt.

Für das Docking der Liganden **4-7** wurde das Programm *Sybyl 6.9*^[77] verwendet. Die Verbindungen wurden zunächst als 3D-Struktur gezeichnet und mit dem Tripos-Kraftfeld energieminimiert. Je 30 verschiedene Konformationen der Liganden wurden in zwei

unterschiedliche Kristallstrukturen des FimH gedockt (Abb. 29). Diese Proteinstrukturen mit den PDB-Codes 1UWF und 1KLF unterscheiden sich lediglich in der Konformation der beiden Tyrosinreste TYR48 und TYR137, die den Eingang der Bindungstasche flankieren.^[25-26] Da die Ausrichtung der beiden Reste offenbar flexibel ist und diese Aminosäureseitenketten einen signifikanten Beitrag zur Affinität der Liganden haben, müssen für die Vorhersage der Ligand-Affinitäten beide Strukturen berücksichtigt werden.

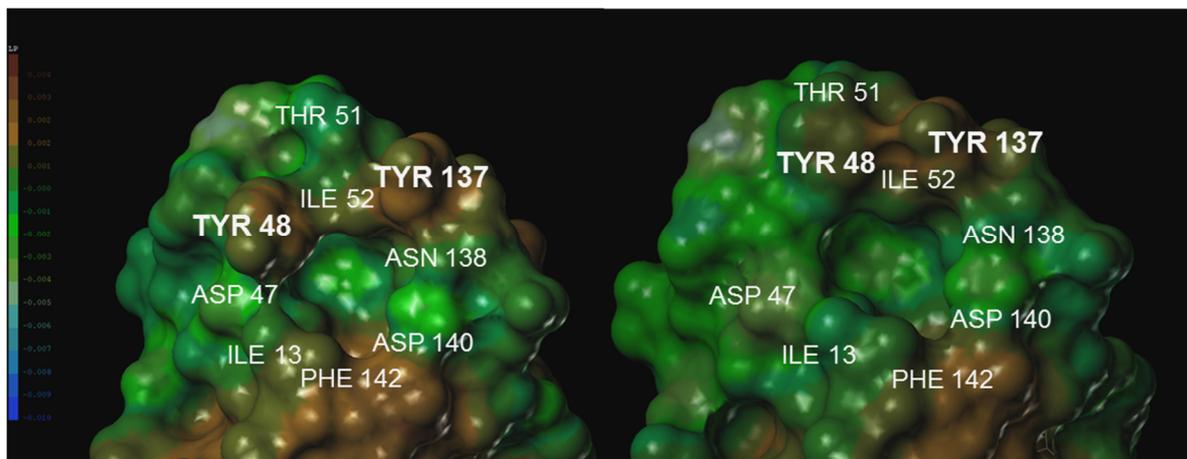


Abb. 29: Connolly-Darstellung^[22] der Bindungstasche des Lektins FimH in der *open gate*-Konformation (links, 1KLF)^[25] und der *closed gate*-Konformation (rechts, 1UWF).^[26] Die molekulare Oberfläche ist nach der Lipophilie der Aminosäurereste gefärbt.^[78-79] Die Skala geht von braun bis blau, wobei eine braune Färbung besonders lipophile Bereiche beschreibt und eine blaue Färbung hydrophile Aminosäurereste kennzeichnet.

Das Docking der Liganden 4-7 ergab, dass die Strukturen 4, 5 und 6 eine hohe Affinität zu beiden Kristallstrukturen des FimH aufweisen. Die Höhe der Affinität der Liganden lässt sich aus dem Scoring-Wert ablesen, der in der Rechnung für jede der 30 Ligandkonformationen erhalten wird. Diese einheitslose Größe ergibt sich aus der Summe mehrerer Terme, welche die verschiedenen Wechselwirkungstypen (van-der-Waals-, Wasserstoffbrücken-, ionische Wechselwirkungen usw.) beschreiben, welche der Ligand mit dem Rezeptor eingeht. Je negativer dieser Wert ist, desto höher ist die Affinität des Liganden zur FimH-Bindungstasche. Da der Wert einheitslos ist, bietet sich ein Vergleich mit Inhibitoren bekannter Bindungsstärke an. Alle drei Liganden zeigen im Vergleich zu *p*NPMa eine höhere Bindungsaffinität (Tab. 1). Ligand 7 hingegen befindet sich in der Simulation hauptsächlich außerhalb der Bindungstasche und bildet unspezifische Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche aus. Die Struktur des Liganden ist nicht optimal für eine Bindung in der Bindungstasche; demnach eignet sich dieser nicht für eine Markierung des FimH. Alle übrigen Liganden zeigen zudem eine höhere Bindungsaffinität zu der *closed gate*-Struktur, was auf eine verstärkte π - π -Wechselwirkung zurückzuführen ist. Das beste Ergebnis wurde für den strukturell einfachsten Liganden 4

erhalten (Abb. 30). Die hohe Affinität kommt unter anderem durch starke π - π -Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Aglycon und den aromatischen Tyrosinresten des Lektins zustande. Des Weiteren wird in Abb. 30 deutlich, dass sich die Diazirinfunktion in unmittelbarer Nähe der Proteinoberfläche befindet, so dass nach der Photoaktivierung eine erfolgreiche Insertion in einen Aminosäurerest des Proteins gegenüber dem Lösungsmittel durchaus bevorzugt sein könnte. Als potentielles Nukleophil für eine Insertionsreaktion käme vor allem die Hydroxylgruppe von THR51 in Frage, welches nach den Docking-Ergebnissen der Diazirinfunktion am nächsten steht. Nach der ausführlichen Betrachtung der Affinitäten der Kohlenhydratliganden zur FimH-Bindungstasche wurden die Liganden **4**, **5** und **6** schließlich für die Synthese ausgewählt, wobei besonders das Diazirin **4** in Affinität zur FimH-Bindungstasche und beim Markierungspotential überzeugt.

Tab. 1: Darstellung der Docking-Ergebnisse der Liganden **4-7**. Aufgelistet sind die Scoring-Werte jeweils für die *closed gate*- und die *open gate*-Konformation von FimH. Die angegebenen Werte korrelieren mit der Bindungsaffinität der Liganden zur Bindungstasche des FimH. Je negativer der Wert ist, desto höher ist die Affinität. Als Referenzwerte sind die Ergebnisse für Methyl- α -D-mannopyranosid (MeMan) und *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (**2**) (*p*NPMan) aufgeführt.^[75]

Ligand	Scoring-Wert <i>closed gate</i> -Struktur	Scoring-Wert <i>open gate</i> -Struktur
4	- 36.2	- 34.7
5	- 34.0	- 28.6
6	- 32.4	- 27.8
7	- 18.8	unspez. Bindung
MeMan ^[75]	- 23.3	- 22.5
<i>p</i> NPMan ^[75]	- 27.4	- 24.9

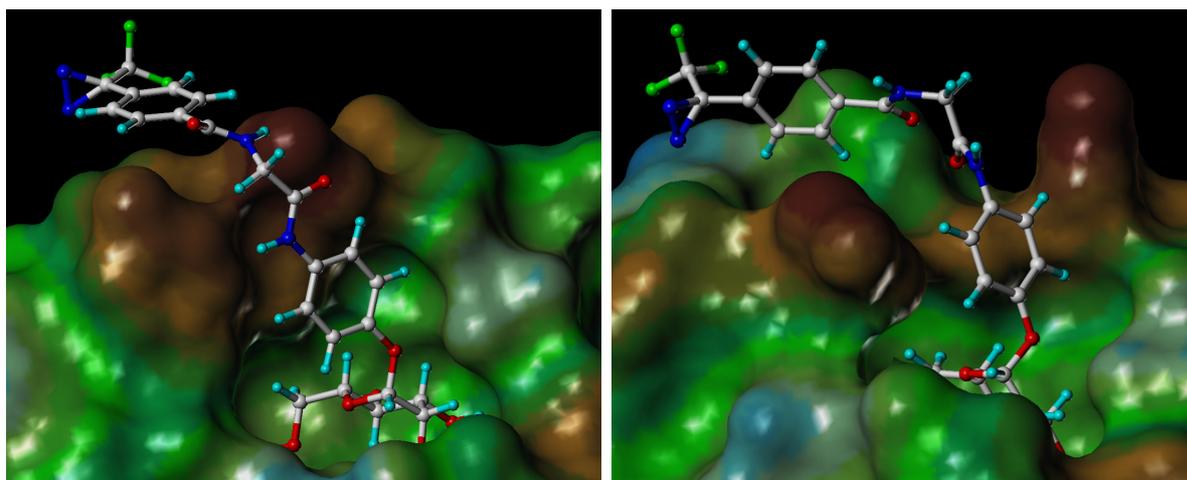


Abb. 30: Dargestellt sind die Docking-Ergebnisse des favorisierten Liganden **4** mit FimH in der *closed gate*-Konformation (links) und in der *open gate*-Konformation (rechts). Die Proteinoberfläche ist als Connolly-Oberfläche dargestellt und nach der Lipophilie der Aminosäurereste gefärbt. Eine braune Färbung beschreibt besonders lipophile Bereiche, eine blaue Färbung kennzeichnet hydrophile Aminosäurereste (Skala siehe Abb. 29).

3.1.2 Synthese eines funktionalisierten Diazirin-Photophors

Für die Synthese photolabiler α -D-Mannosidliganden musste zunächst das Diazirin-Photophor synthetisiert und mit einer geeigneten Funktionalität für die Kupplung mit einem α -D-Mannosidliganden ausgestattet werden. Eine Carboxy-Funktion bietet sich hierfür besonders an, da sie die Verknüpfung beider Bausteine über Peptidkupplungsreaktionen ermöglicht.^[80] Daher wurde die literaturbekannte Synthese des *p*-Carboxy-funktionalisierten Diazirins **18** ausgehend von *p*-Brombenzylalkohol (**8**) durchgeführt (Abb. 31).^[72] Im ersten Schritt wurde die Hydroxylgruppe mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid in absolutem *N,N*-Dimethylformamid in Gegenwart von Imidazol geschützt, wobei der Silylether **9** in sehr guter Ausbeute erhalten wurde. Das für die Synthese des Trifluoracetats **12** benötigte *N*-Trifluoracetyl-piperidin (**11**) wurde aus Piperidin (**10**) mit Trifluoressigsäureanhydrid und Triethylamin in absolutem Diethylether dargestellt. Triethylamin fungiert hierbei als Base und aktiviert das Stickstoffatom des Piperidins für den Angriff an die Carbonylfunktion des Trifluoressigsäureanhydrids. Das erhaltene *N*-Trifluoracetyl-piperidin (**11**) konnte nun mit dem Bromid **9** und *n*-Butyllithium in absolutem Diethylether zum entsprechenden Trifluoracetat **12** umgesetzt werden. Diese Reaktion verläuft über eine Lithiierung des Arylringes und Substitution des Piperidin-Ringes in **11**. Die Carbonylverbindung **12** wurde dann mit Hydroxylamin-Hydrochlorid in Pyridin

zunächst zum Oxim **13** umgesetzt. Anschließend führte eine dreistufige Synthesesequenz zum geschützten Diazirin **16**. Dabei wurde nach wässriger Aufarbeitung jeweils mit dem Rohprodukt weitergearbeitet. Zunächst wurde das Oxim **13** *O*-tosyliert, um es für den nächsten Syntheseschritt zu aktivieren. Die Umsetzung erfolgte mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid und *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP), das als Katalysator die Reaktivität des Tosylierungsreagenzes erhöht. Für die Reaktion zum instabilen Diaziridin **15** wurde Ammoniak bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ in den Reaktionsansatz einkondensiert. Dieser greift mit seinem freien Elektronenpaar am sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatom des Oxims **14** an und bildet eine zwitterionische Zwischenstufe.

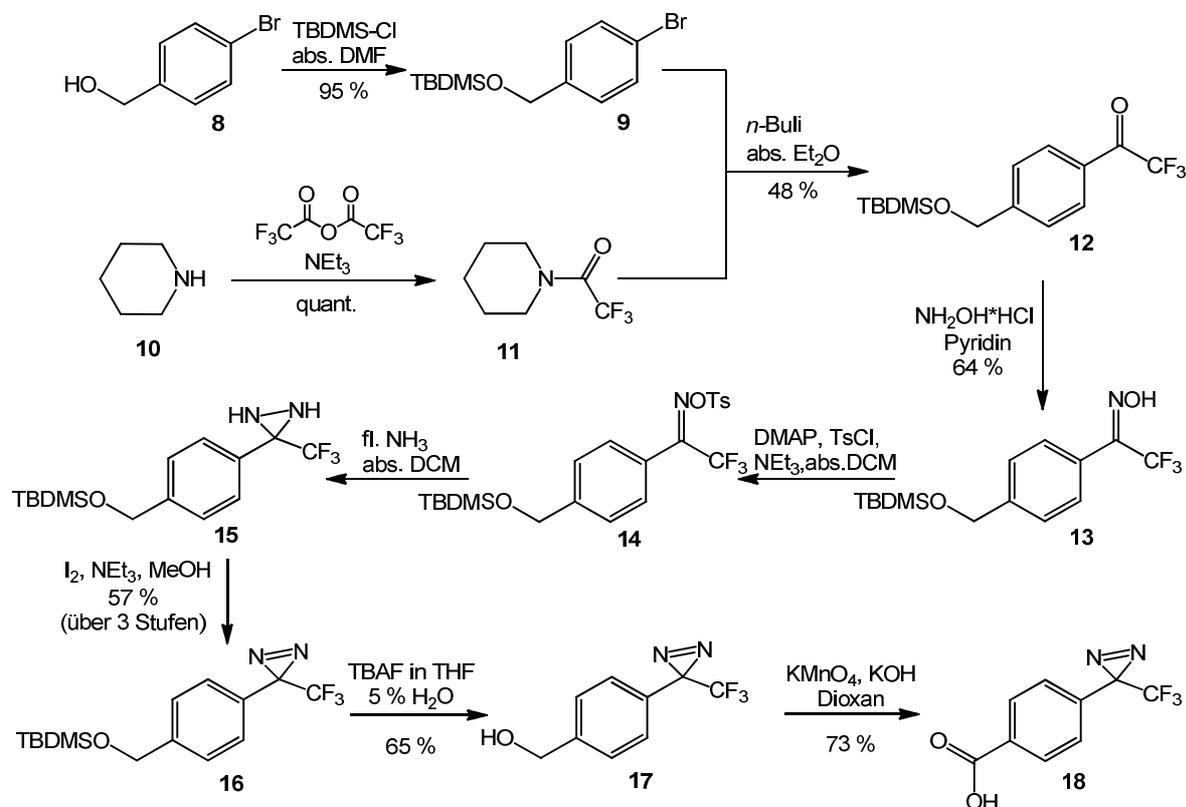


Abb. 31: Das Carboxy-funktionalisierte Diazirin **18** wird in einer neunstufigen Synthesesequenz ausgehend von *p*-Brombenzylalkohol (**8**) über die Zwischenstufen des Oxims **13** und des Diaziridins **15** dargestellt.^[72]

Nach Deprotonierung der Ammonium-Gruppe erfolgt unter Substitution von Tosylat der intramolekulare Ringschluss zum Diaziridin **15**. Der letzte Schritt besteht schließlich in der Oxidation des Diaziridins **15** zum Diazirin **16** mit einer 10 %igen Iod-Lösung in Methanol. Über drei Stufen konnte so eine Ausbeute von 57 % an reinem Diazirin **16** erzielt werden. Danach gelang die Entschützung der Hydroxylgruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran, wobei der Alkohol **17** erhalten wurde. Die nachfolgende Oxidation mit

Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung lieferte das gewünschte photoaktive Carboxy-funktionalisierte Diazirin **18** in einer Ausbeute von 73 %.

3.1.3 Synthese photolabiler Mannosidliganden

Für die Kupplungsreaktionen des *p*-Carboxy-funktionalisierten Diazirins **18** zu den photolabilen Mannosiden **4**, **5** und **6** werden nun Amino-funktionalisierte Mannoside benötigt. Die Synthese des Zielmoleküls **4** startete deshalb ausgehend von *p*-Nitrophenylmannosid (**2**), welches mit Wasserstoff unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle als Katalysator in Methanol zunächst zum Amin **19** reduziert wurde (Abb. 32).^[81] Vor der Reaktion mit dem Diazirin **18** wurde das Amin **19** in einer HATU-vermittelten Kupplungsreaktion mit Boc-geschütztem Glycin und Diisopropylamin (DIPEA) als Base quantitativ zum Glycopeptid **20** umgesetzt. Das Kupplungsreagenz HATU aktiviert dabei die Carbonsäure in Form eines Aktivesters, wodurch der Angriff desamins begünstigt wird. Die Aminosäure als Platzhalter vor dem Diazirin **18** steigert die Flexibilität des Liganden, so dass eine Wechselwirkung des Aglycons mit der Proteinoberfläche vereinfacht ist. Im letzten Schritt wird das endständige Amin des Glycopeptids **20** mit Trifluoressigsäure in Wasser zunächst entschützt und anschließend in einer weiteren Kupplungsreaktion zur Zielverbindung **4** umgesetzt. Die niedrigere Ausbeute ist dabei durch die teilweise Zerstörung der Diazirinfunktion durch Licht oder Wärme und daraus folgenden Insertionsprodukten während der mehrfachen Säulenchromatographie zurückzuführen.

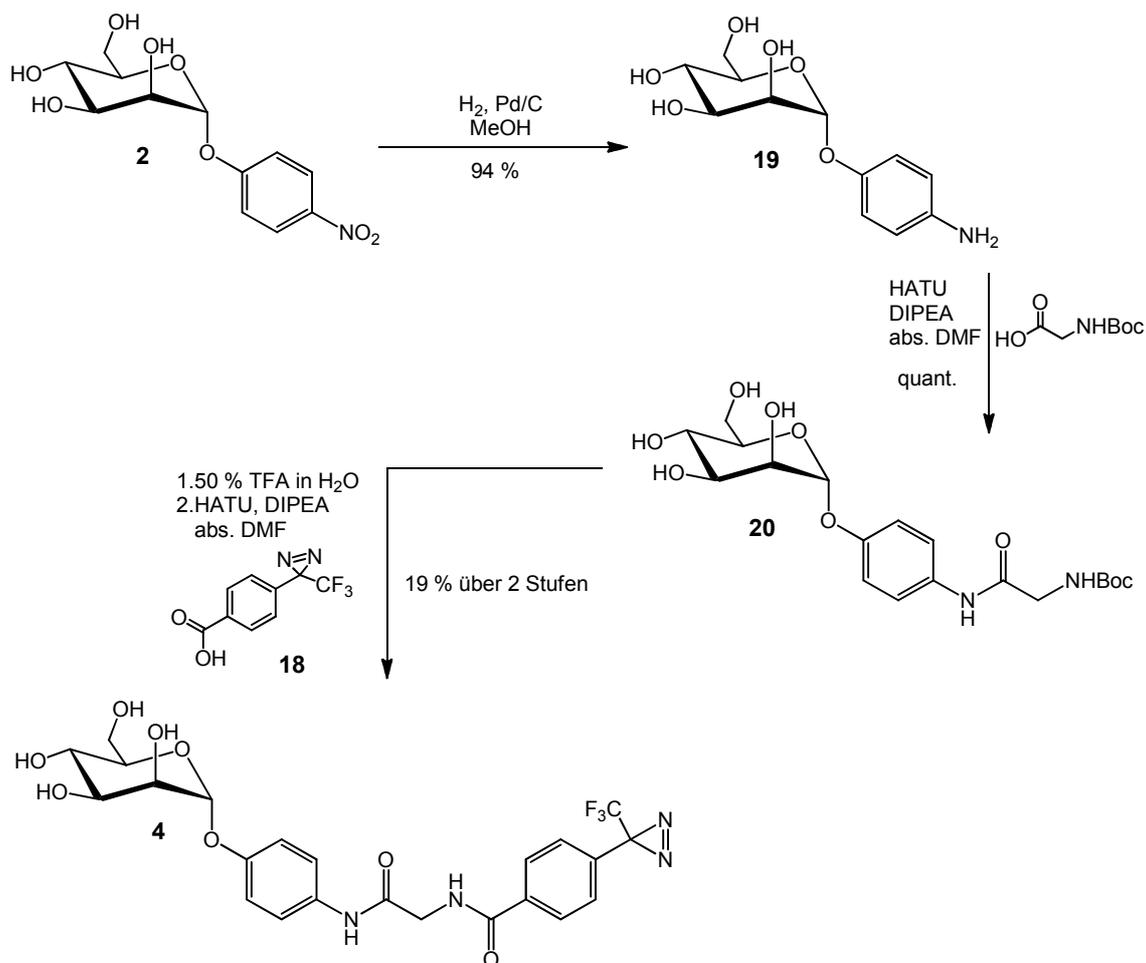


Abb. 32: Synthese des photolabilen Mannosidliganden **4** ausgehend von *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid (**2**).

Für die Synthese des photolabilen Liganden **5** wurde zunächst das Quadratsäuremonoamid **3** in einer Substitutionsreaktion mit *p*-Aminophenylmannosid (**19**) und dem Quadratsäurediester **21** hergestellt (Abb. 33).^[75] Das primäre Amin greift dabei nukleophil an einem der aktivierten Kohlenstoffatome des Quadratsäurederivates **21** in α -Position zur Carbonylfunktion an, wobei Methanol abgespalten wird. Für die Reaktion zum Diamid **22** wird neben *N*-Boc-Ethylendiamin auch Triethylamin zur Steigerung der Reaktivität zugegeben. Damit wurde das Boc-geschützte Quadratsäurediamid **22** in einer Ausbeute von 92 % erhalten. Nach der Entschützung des Amins mit Trifluoressigsäure in Wasser wurde in einer HATU-vermittelten Kupplungsreaktion mit dem Diazirin **18** das Zielmolekül **5** erhalten. Das Produkt wurde dargestellt, jedoch konnte ein entstandenes Nebenprodukt, das durch die Zersetzung der Diazirinfunktion entstand, nicht vollständig abgetrennt werden. Die Ausbeute wurde dadurch nicht bestimmt. Ob die Diazirinfunktion intakt ist, lässt sich besonders gut aus dem ^{19}F -NMR erkennen. Für das Signal der Trifluormethylgruppe ergibt sich ein Hochfeld-Shift, sobald der Stickstoff aus dem Molekül entfernt ist. Das erhaltene Produktgemisch konnte aber dennoch für Bestrahlungsreaktionen

verwendet werden, da nur ein intaktes Diazirin photochemisch aktiviert zu einer Insertionsreaktion befähigt ist.

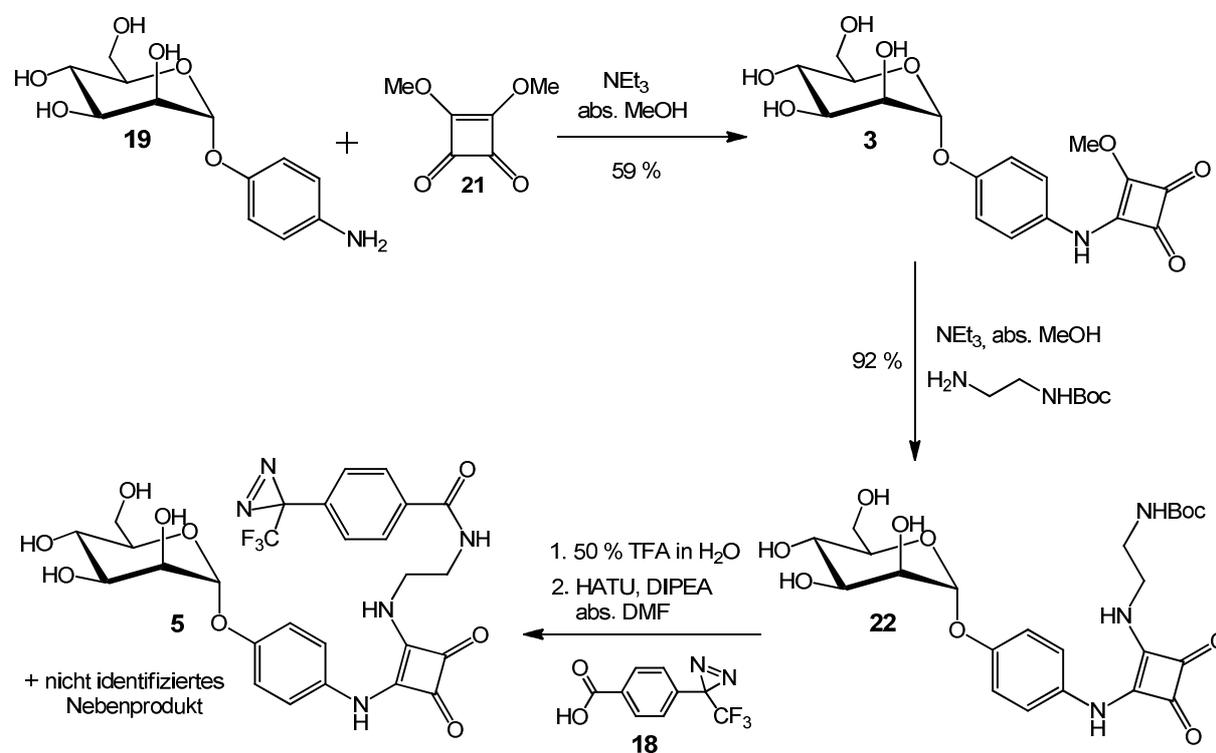


Abb. 33: Synthese des photolabilen Mannosidliganden **5** ausgehend von *p*-Aminophenylmannosid (**19**).

Die Synthese des bidentalen Bisdiazirins **6** erfolgte ausgehend von dem Glycoaminosäure-Derivat **20**, welches zunächst mit Trifluoressigsäure in Wasser zum primären Amin entschützt und nach Lyophilisation direkt in einer Michael-analogen Reaktion mit Methylacrylat zweifach funktionalisiert wurde.^[82] Der nukleophile Angriff des primären Amins erfolgt dabei wie erwartet in β -Position des Michael-Akzeptors. Der entstandene Bismethylester **24** wurde mit Ethylendiamin amidiert und zur besseren Aufreinigung nach Entfernung des überschüssigen Ethylendiamins im gleichen Schritt Boc-geschützt. Ein Versuch **23** direkt mit *N*-Boc-Ethylendiamin zu **24** umzusetzen schlug fehl, was wahrscheinlich auf eine zu geringe Basizität der Lösung zurückzuführen ist. Die Schutzgruppe wurde schließlich mit Trifluoressigsäure in Wasser abgespalten und das resultierende Diamin in einer HATU-vermittelten Kupplungsreaktion mit dem Diazirin **18** zum Zielmolekül **6** umgesetzt, das lediglich massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte. Eine Isolation war nicht möglich (Abb. 34).

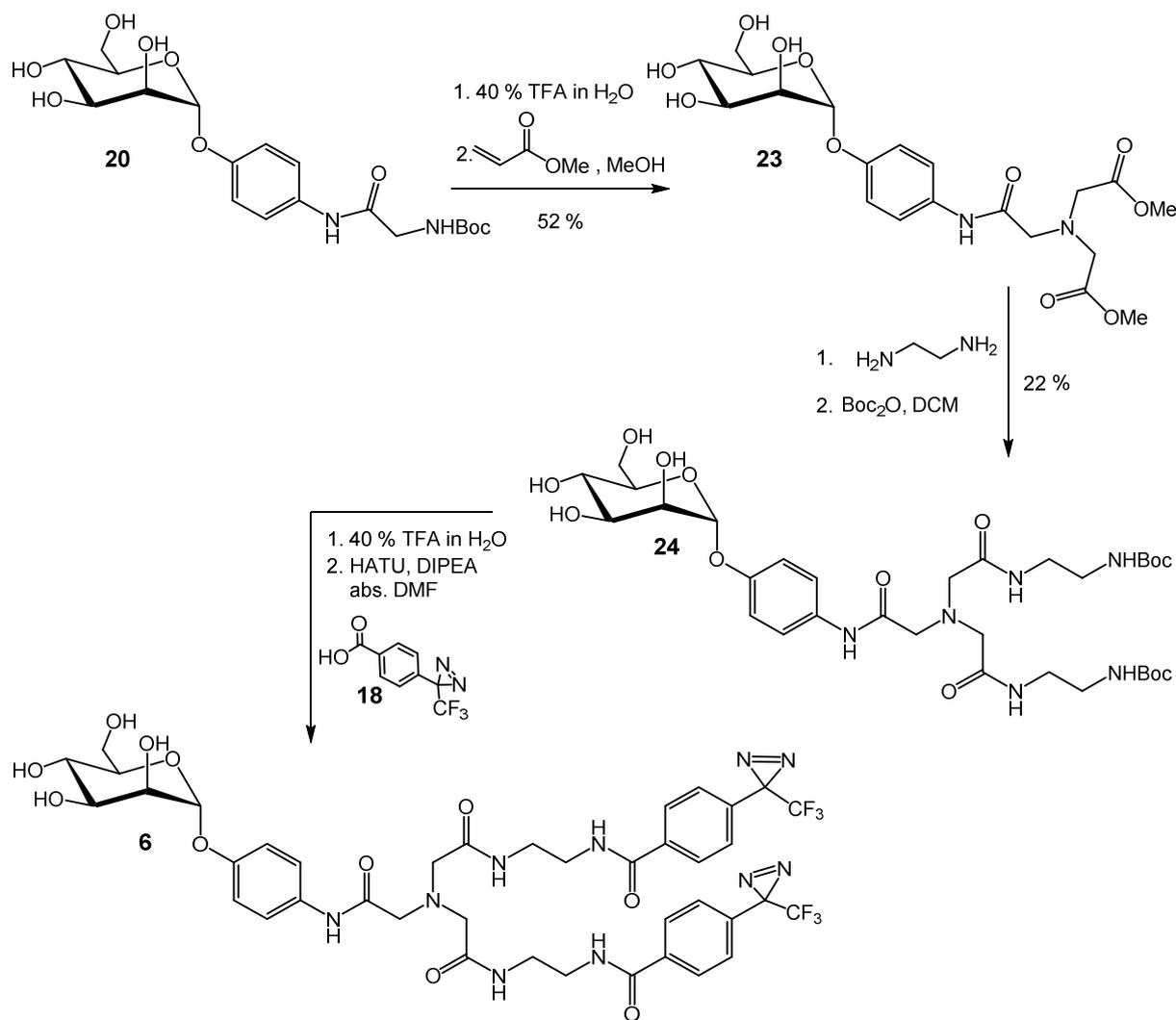


Abb. 34: Syntheseroute zum photolabilen Mannosidliganden **6** ausgehend vom Glycopeptid **20**.

Die Aufreinigung der Diazirin-Endstufen **4-6** erwies sich in allen drei Fällen als besonders schwierig. Zum einen wegen ihrer geringen Löslichkeit in Lösungsmitteln für die Normalphasen-Säulenchromatographie und zum anderen wegen der vielen Nebenprodukte, welche durch die Zersetzung der Diazirine während der Reaktion und Aufarbeitung entstehen. Diese unterscheiden sich in ihrer Polarität oft kaum von dem Produkt, so dass eine Aufreinigung äußerst kompliziert ist. Alle Reaktionen und Aufreinigungen mussten zudem unter Ausschluss von Licht geschehen. Durch diese Faktoren und zudem den Aufwand, den die Darstellung des Diazirins **18** erfordert, erscheint die Verwendung von Diazirinen für die Markierung der FimH-Bindungstasche zumindest unter dem Gesichtspunkt der Praktikabilität als nicht optimal, zumal keine der synthetisierten Verbindung in reinem Wasser löslich ist. Mit den synthetisierten photolabilen Mannosiden **4** und **5** wurden dennoch erste Versuche für die Markierung von

FimH an der Bindungstasche durchgeführt. Ligand **6** dagegen wurde nicht in ausreichender Menge und Reinheit erhalten und daher in Bestrahlungsversuchen nicht berücksichtigt.

3.1.4 Photochemische Markierung von FimH

Für die ersten Versuche zur photochemischen Markierung der FimH-Bindungstasche wurde der Ligand **4** ausgewählt. Wie aus dem Absorptionsmaximum des gemessenen UV-Vis-Spektrums des photolabilen Mannosids **4** hervorgeht, erfolgt die Aktivierung der Diazirinfunktion zum Carben durch Bestrahlung mit Licht bei 345 nm (Abb. 35).

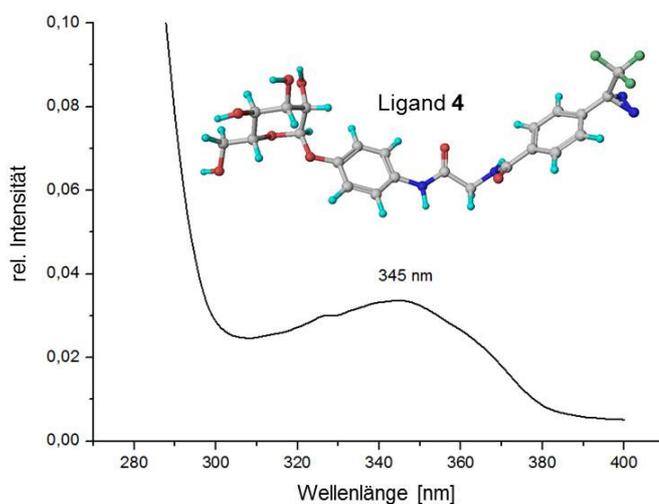


Abb. 35: UV-Vis-Absorptionsspektrum des synthetisierten photolabilen Mannosids **4**. Das Absorptionsmaximum der Diazirinfunktion liegt bei 345 nm.

Vor dem Versuch der Markierung des FimH wurde die Photoreaktion zunächst an sechs verschiedenen Peptiden mit je 9-11 Aminosäuren getestet. Da sich in der Nähe der FimH-Bindungstasche die Aminosäuren Tyrosin als auch Threonin befinden und diese potentielle Reaktionspartner für das Carben darstellen, wurde darauf geachtet, dass diese auch in der Sequenz der zu testenden Peptide vorhanden sind (Tab. 2). Zunächst wurden die Peptide und Ligand **4** jeweils in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Da der Ligand **4** in reinem Wasser nicht gelöst werden konnte, wurde eine Reaktionsmischung mit 50 % Methanol gewählt. Die Peptide und Diazirin **4** wurden unter Lichtausschluss für 15 min im Inkubator bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung 10 min unter Eiskühlung bestrahlt und per MALDI-MS untersucht. Die Spektren zeigten kein derivatisiertes Produkt, woraufhin eine weitere Messung per ESI-MS stattgefunden hat. In den daraus erhaltenen Spektren konnten

ERGEBNISSE

zwei neu entstandene Molekülmassen detektiert werden. Zum einen ergab sich für alle Bestrahlungsversuche ein Derivatisierungsprodukt von Ligand **4** in ein Wassermolekül ($M = 530.1$ Da).

Tab. 2: Übersicht der Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente mit Ligand **4** und verschiedenen Standardpeptiden. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Code beschrieben (*entspricht dem Carben nach Bestrahlung des Liganden **4**).

Standardpeptid	Detektierte Massen [m/z]	Identifizierte Produkte nach Bestrahlung mit 4
ILMEHIHKL (M2)	530.2 [M+H] ⁺	Ligand*+H ₂ O
	832.4 [M+2H] ²⁺	Peptid+Ligand*+H ₂ O
YLLPAIVHI (M3)	530.2 [M+H] ⁺	Ligand*+H ₂ O
	698.9 [M+2H] ²⁺	Peptid+Ligand*+H ₂ O
EIAMATVTALR (M7)	530.2 [M+H] ⁺	Ligand*+H ₂ O
	853.4 [M+2H] ²⁺	Peptid+Ligand*+H ₂ O
ETIGEILKK (M8)	530.2 [M+H] ⁺	Ligand*+H ₂ O
	780.9 [M+2H] ²⁺	Peptid+Ligand*+H ₂ O
EGHIARNCRA (T3)	530.2 [M+H] ⁺	Ligand*+H ₂ O
RPQYAEASWNAR (S17)	530.2 [M+H] ⁺	Ligand*+H ₂ O
	989.9 [M+2H] ²⁺	Peptid+Ligand*+H ₂ O

Für alle Peptide mit Ausnahme von **T3** war zudem ein weiterer Massenpeak im Spektrum sichtbar, der allerdings nicht der berechneten Masse für das Produkt der Insertionsreaktion des Carbens (nach Bestrahlung von **4**) mit dem jeweiligen Peptid entsprach (Abb. 36). Am Beispiel von **M2** soll der Ursprung dieses Peaks kurz diskutiert werden. Im ESI-MS-Spektrum des Peptids **M2** wurde ein Massenpeak von $m/z = 832.4$ [M+2H]²⁺ identifiziert (Abb. 37). Bei einer Ladung von $z = 2$ entspricht dies demnach einer Molekülmasse von 1662.8 Da. Der Massenunterschied zum Originalpeptid ($M = 1132.6$ Da) beträgt 530.2 Da. Für eine erfolgreiche Modifikation des Peptids mit Ligand **4** wäre jedoch ein Massenunterschied von 512.1 Da zu erwarten gewesen. Es wurde daher vermutet, dass der neu entstandene Peak für **M2** sowie für die anderen Standardpeptide jeweils einem nicht-kovalenten Addukt des Insertionsproduktes des Carbens mit einem Wassermolekül und dem betrachteten Peptid entspricht.

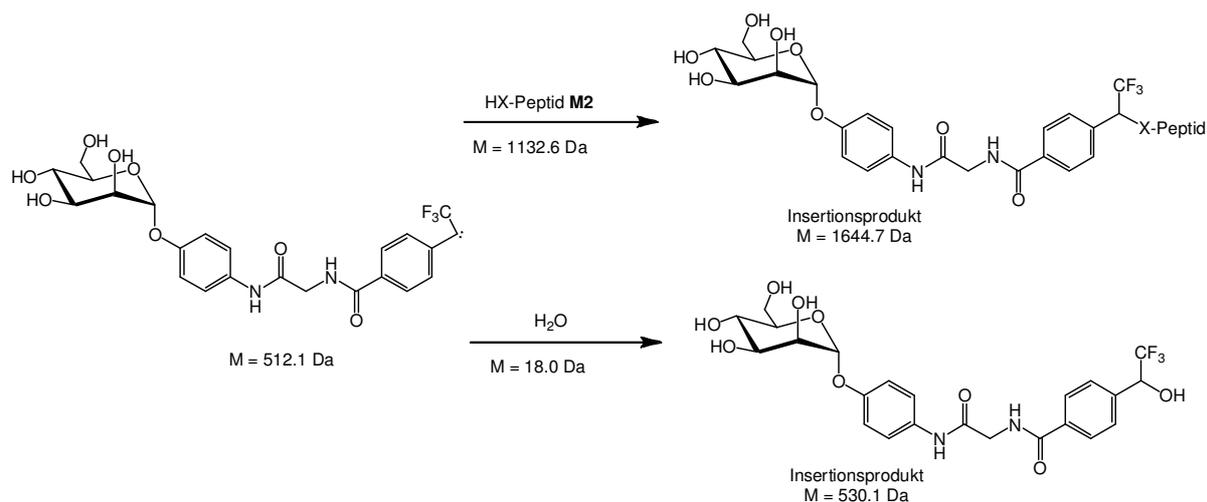


Abb 36: Darstellung der theoretischen Produkte der Insertionsreaktion des Carbens, welches aus der Photoreaktion von Ligand **4** entsteht, mit Peptid **M2** bzw. mit einem Wassermolekül ($X = O, N, C$).

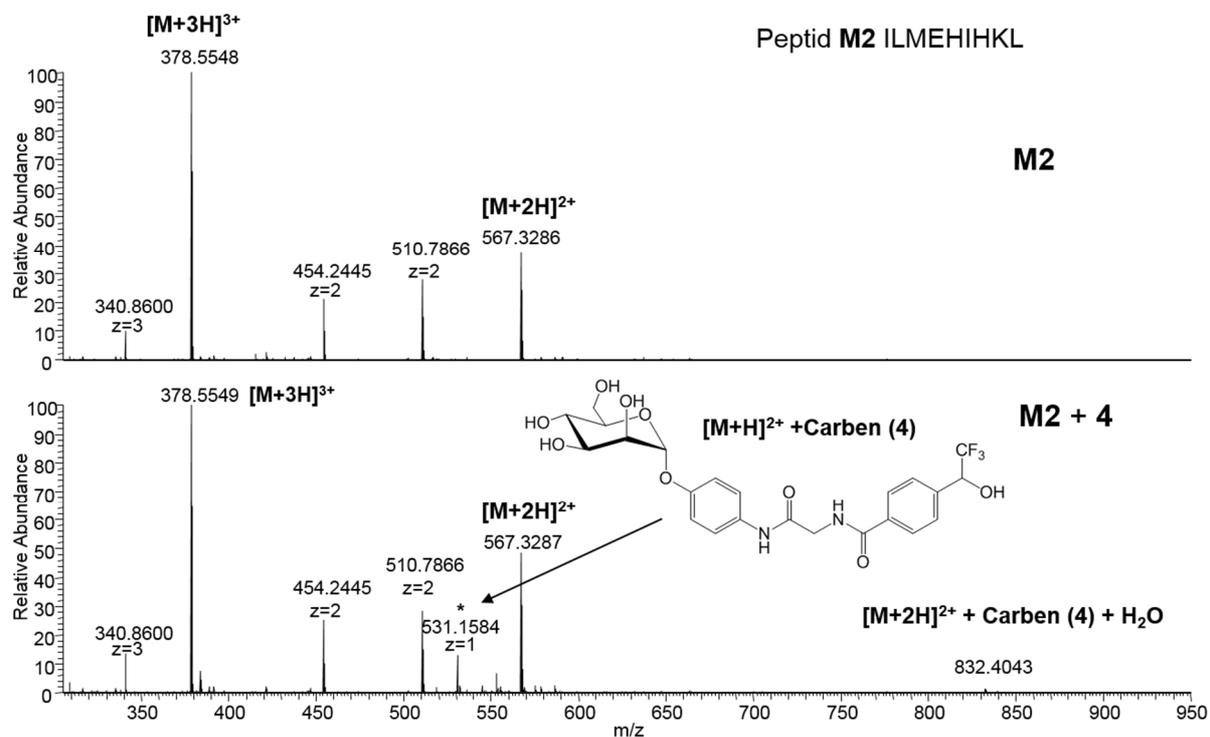


Abb. 37: ESI-MS-Spektrum des Standardpeptids **M2** vor und nach der Bestrahlungsreaktion mit Diazirin **4**. Der markierte Peak bei $m/z = 531.2$ $[M+H]^+$ entspricht einem Derivatisierungsprodukt des Carbens (**4-N₂**) + H₂O. Der Peak $m/z = 832.4$ $[M + 2H]^2+$ entspricht der Masse eines nicht-kovalenten Produktes aus Peptid **M2** und dem Carben (**4-N₂**) + H₂O.

Um die Hypothese eines nicht-kovalenten Adduktes weiter zu untersuchen, wurde für die entsprechenden Peptidmassen eine MS/MS-Sequenzierung durchgeführt. In der Analyse konnten Fragmente der Originalpeptide identifiziert werden, kein detektiertes Fragment wies

jedoch auf eine Modifizierung der Peptide hin (Spektren siehe Anhang 6.1.1). Um in folgenden Versuchen die Nebenreaktion mit den Wassermolekülen zu verringern, wurde zunächst das Verhältnis von Peptid zu Ligand verändert. So wurde in einem weiteren Versuch mit **S17** das Peptid in zehnfachem Überschuss zum Liganden **4** eingesetzt. Auch hierbei war jedoch kein Insertionsprodukt des Carbens mit Peptid **S17** detektierbar. In analogen Versuchen mit dem Lektin FimH_{tr} war ebenfalls kein positives Ergebnis zu verzeichnen. Da die Carbene bevorzugt in Hydroxyl-Gruppen insertieren, im Gegensatz zu Nitrenen, die vor allem mit CH-Gruppen reagieren, könnte die Wahl des Lösungsmittels für eine erfolgreiche Markierung des FimH_{tr} mit entscheidend sein. Daher wurde nach einem alternativen organischen Lösungsmittel als Zusatz für die Reaktionsmischung gesucht.

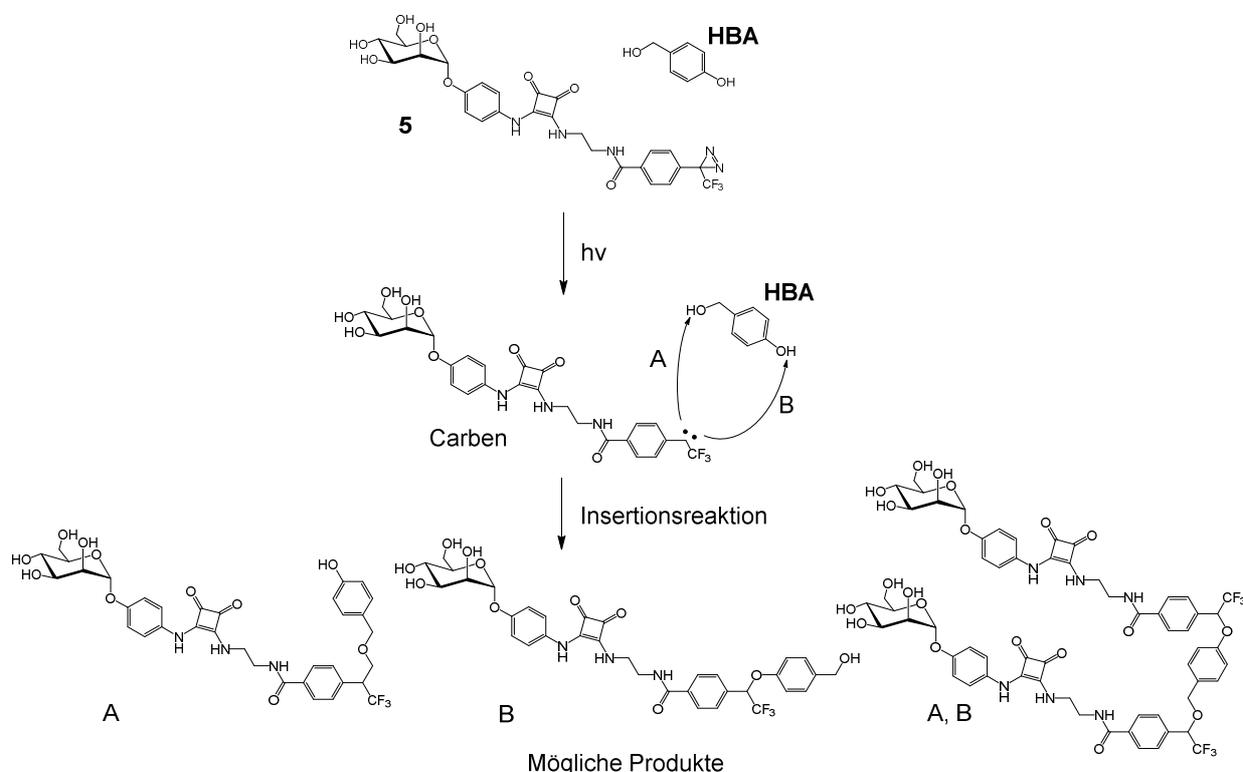


Abb. 38: Reaktionsablauf der Photoreaktion von Diazirin **5** mit anschließender Insertionsreaktion des Carbens in 4-Hydroxybenzylalkohol (**HBA**) unter Nennung der wahrscheinlichsten Insertionsprodukte.

Dazu wurde die Bestrahlung des Diazirin-funktionalisierten Liganden **5** zusammen mit 4-Hydroxybenzylalkohol (**HBA**) als Testsubstanz mit 50 % Acetonitril- bzw. 50 % DMSO-Anteil in wässriger Lösung getestet (Abb. 38). Für beide Versuche konnte erstmals eine erfolgreiche

Insertion des Carbens (nach Bestrahlung von **5**) in den Benzylalkohol festgestellt werden. Allerdings war auch beide Male das Insertionsprodukt mit Wasser detektierbar (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht der Bestrahlungsexperimente von Ligand **5** und 4-Hydroxybenzylalkohol (**HBA**) unter der Verwendung von 50 % DMSO- bzw. 50 % Acetonitril-Anteil in wässriger Lösung. Die Reaktionslösung wurde erst 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 min bestrahlt.

Verbindung	Lösungsmittel	Detektierte Produkte
5 + 4-Hydroxybenzylalkohol (HBA)	DMSO, Wasser, 1:1	Insertionsprodukte
		(5 -N ₂) + HBA ^a (5 -N ₂) + H ₂ O ^b
5 + 4-Hydroxybenzylalkohol (HBA)	Acetonitril, Wasser, 1:1	Insertionsprodukte
		(5 -N ₂) + HBA ^a (5 -N ₂) + H ₂ O ^b

a) $m/z = 740$ [M+Na]⁺, b) $m/z = 634$ [M+Na]⁺

Im Anschluss wurden zwei weitere Versuche mit FimH_{tr} und Ligand **4** unternommen. Dazu wurde das Diazirin **4** jeweils in hohem Überschuss (70:1) zu der Proteinlösung in PBS-Puffer gegeben, die in einem Fall mit 50 % Acetonitril-Anteil und im anderen Fall mit 10 % DMSO versetzt war. Für beide Reaktionen konnte erstmalig ein modifiziertes Protein identifiziert werden (Abb. 39). Der größte Massenpeak ($m/z = 1337.5$) entspricht jeweils dem nicht modifizierten FimH_{tr}. Ein einfach markiertes Produkt ($m/z = 1412.9$) konnte für beide Versuch nur in sehr geringem Anteil identifiziert werden. Durch den Vergleich der Intensitäten der Massenpeaks des nicht-modifizierten und des einfach-modifizierten FimH_{tr} konnte eine ungefähre Ausbeute der Markierungsreaktion bestimmt werden. Dabei ergab sich ein Umsatz von 1.41 % für den Versuch mit Acetonitrilzusatz bzw. von 1.55 % für die Reaktion mit DMSO-Anteil (Tab. 4). Durch anschließende enzymatische Hydrolyse und MS/MS-Analyse konnte jedoch kein markiertes Peptidfragment nachgewiesen werden, wodurch der Ort der Markierungsreaktion nicht identifiziert werden konnte. Möglicherweise ist die aus der Insertionsreaktion entstandene kovalente Bindung zum Protein unter den gewählten Bedingungen nicht stabil genug oder die Ausbeute der Markierungsreaktion war zu gering.

ERGEBNISSE

Tab. 4: Ergebnis der Bestrahlung von Ligand **4** mit FimH_{tr} mit 50 % Acetonitril- bzw. 10 % DMSO-Anteil in PBS-Puffer. Dargestellt sind die im ESI-MS identifizierten Massenpeaks für das nicht-modifizierte und das einfach modifizierte FimH_{tr} sowie die ungefähre Ausbeute der Markierungsreaktion, welche im LC-MS durch Vergleich der Peakintensitäten ermittelt wurde.

Ligand (Anteil org. Lösungsmittel)	FimH _{tr} (<i>m/z</i>)	Einfaches Markierungsprodukt (<i>m/z</i>)	Markierungsausbeute (%)
4 (50 % ACN)	1373.4617	1412.8577	1.41
4 (10 % DMSO)	1373.5391	1412.8583	1.55

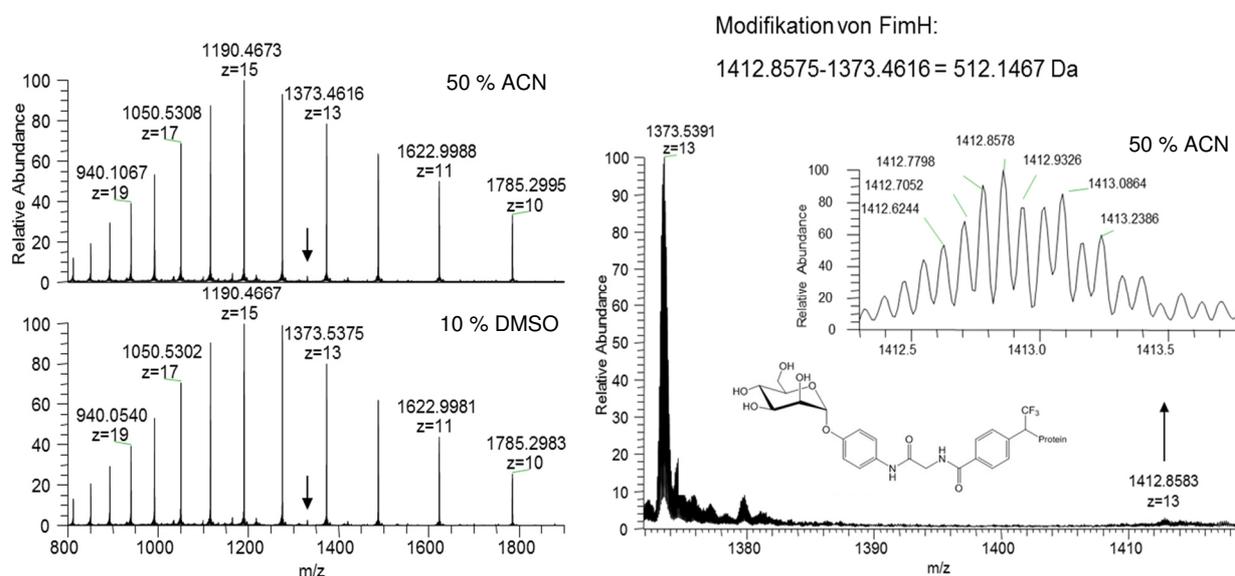


Abb. 39: ESI-MS-Spektren der Markierungsversuche mit dem Liganden **4** und FimH_{tr} in 50 % Acetonitril (ACN)- bzw. 10 % DMSO-Anteil in PBS-Puffer. Der Molekülpeak des FimH_{tr} liegt bei *m/z* = 1373.5, das modifizierte Lektin hat eine Masse von *m/z* = 1412.9, was bedeutet, dass der Ligand **4** einmal an das FimH_{tr} gebunden ist (*z* = 13).

Die allgemein niedrigen Insertionsausbeuten der Photomarkierung sind ein großer Nachteil dieser Methode. Ist nach der Bestrahlung des Diazirins nicht die Proteinoberfläche, sondern ein Lösungsmittelmolekül in unmittelbarer Nähe, so ist dieses auch der bevorzugte Reaktionspartner des intermediär gebildeten Carbens. Dieser Nachteil ist der kurzen Lebensdauer des Carbens geschuldet; der Vorteil der hohen Reaktivität des Intermediats ist allerdings, dass unspezifische Reaktionen an der Proteinoberfläche weitestgehend nicht vorkommen. Die Insertionsreaktion mit einer Aminosäureseitenkette des Proteins sollte demnach, wenn sie stattfindet, sehr selektiv in Nähe der Bindungstasche geschehen, da dies die

bevorzugte Position des Liganden darstellt. Liganden, die durch die Dynamik des Bindungsprozesses die Bindungstasche verlassen, reagieren stattdessen mit dem Lösungsmittel. Bei den durchgeführten Versuchen war die Markierungsausbeute mit höchstens 1.55 % sehr niedrig. In diesem Fall steht die geringe Ausbeute jedoch wahrscheinlich auch im Zusammenhang mit der schlechten Löslichkeit des Liganden **4** unter den gewählten Bedingungen. Insgesamt war die Verwendung von Diazirinen für die Markierung von FimH nicht ideal. Der Versuch der Optimierung des Ligandendesigns in Hinblick auf eine höhere Affinität zur FimH-Bindungstasche ging einher mit einer Erniedrigung der Wasserlöslichkeit. Dadurch wurde neben der Durchführung der biologischen Tests auch die Aufreinigung der Produkte erschwert. Zukünftig sollte die Wasserlöslichkeit der photolabilen Liganden mehr im Vordergrund der Entwicklung stehen, so dass ein weniger bipolarer Ligand die Handhabung der Diazirine im Allgemeinen vereinfacht. Will man jedoch eine hohe Ausbeute der Markierungsreaktion am Protein erreichen, sollte ein Wechsel der photolabilen Gruppe hin zu weniger reaktiven Funktionen wie α -Halogenketonen oder Epoxiden betrachtet werden, welche im Vergleich zum Carben eine höhere Stabilität in wässriger Umgebung gewährleisten.

3.2 Design und Synthese photoschaltbarer Liganden für das bakterielle Lektin FimH

In den letzten Jahren wurde die Methodenentwicklung für die affinitätsgesteuerte Markierung von Proteinen immer weiter vorangetrieben. Von dem photoaffinitätsbasierten Konzept ausgehend wurde die Methodik in Hinblick auf Effizienz und Einfachheit in der Anwendung entwickelt. Dabei ging es insbesondere um die Verbesserung der Markierungsausbeuten, die wegen der teils zu hohen Reaktivität der Reaktionsintermediate oft zu gering ausfielen. Auch in dieser Arbeit stellte sich die Verwendung photolabiler Diazirinliganden für die Markierung des FimH als nicht optimal heraus. Darüber hinaus ist die Synthese der Diazirinderivate sehr aufwendig. Für eine Optimierung der Markierung von Proteinen wie FimH ist es daher sinnvoll, die photolabilen Gruppen (Diazirine) durch stabilere reaktive Funktionen zu ersetzen. SAMES *et al.*^[46] verwendeten erstmals Epoxide für die chemische Markierung von Proteinen. Epoxide sind sehr elektrophil, in wässriger Lösung mit Proteinen aber weitaus stabiler als Carbene, woraus eine höhere Markierungsausbeute resultiert.

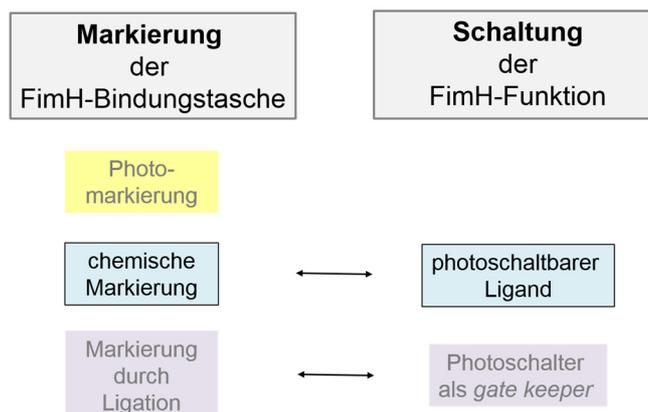


Abb. 40: Das Teilprojekt in diesem Kapitel befasst sich erstmals neben dem Ziel der Markierung der FimH-Bindungstasche mit der photochemischen Schaltung der Lektin-Funktion unter Verwendung eines photoschaltbaren Liganden.

Als Alternative zur Photomarkierung wurde nach dem Vorbild von SAMES *et al.* die Verwendung einer chemischen Markierungsstrategie für FimH entwickelt. In diesem Kontext stand jedoch erstmals auch eine neue Idee im Vordergrund (Abb. 40). Mit Hilfe der reaktiven Liganden wird die Schaltung der FimH-Funktion zusätzlich ermöglicht. Die Konzeption dieses Projektes erfolgte vor allem in Anlehnung an die Arbeiten von TRAUNER *et al.*^[63], die photoschaltbare Epoxidliganden verwendeten, um eine Enzymfunktion photochemisch zu kontrollieren. Der verwendete molekulare Photoschalter bestand in einer Azobenzoleinheit, welche ebenfalls in der vorliegenden Arbeit benutzt wurde. Die Synthese^[83] und

Photochemie^[84] des Azobenzols ist in der Literatur gut untersucht. Zudem wurde dieser Photoschalter bereits für eine Reihe komplexer biologischer Anwendungen genutzt.^[85] Photochemisch induziert geht Azobenzol eine *cis/trans*-Isomerisierung ein. Der Übergang vom *trans*- in den *cis*-Zustand erfolgt dabei bei 340 nm, die Rückisomerisierung thermisch oder bei 450 nm (Abb. 41). Die weniger stabile *cis*-Konfiguration ist im Gegensatz zum *trans*-Isomer gebogen und verdreht und bei Betrachtung der *para*-ständigen Kohlenstoffatome um ~ 3.5 Å kürzer. Die photoinduzierte Isomerisierung ist sehr effizient und außerdem im Bereich von Pikosekunden schneller als die meisten biologischen Prozesse ablaufen.^[86-88]

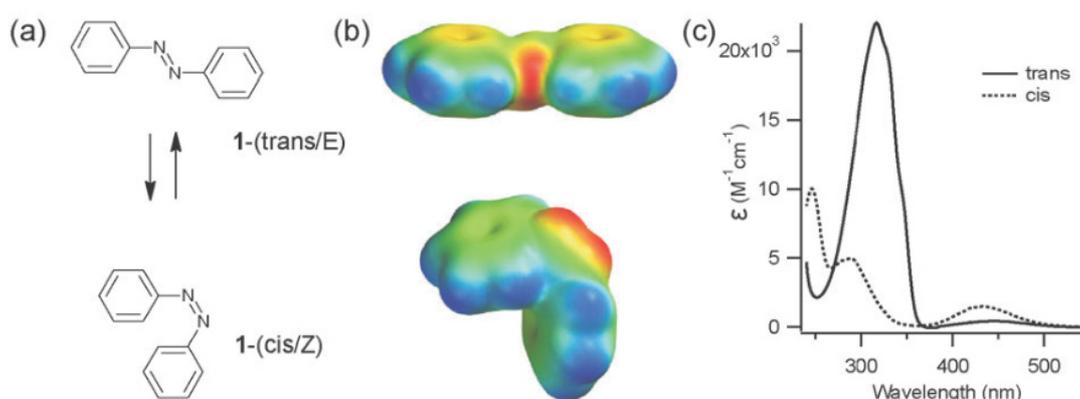


Abb. 41: Dargestellt sind das *trans*- und das *cis*-Isomer des Azobenzols in 2D-Struktur (a), in 3D-Struktur mit molekularer Oberfläche, gefärbt nach dem elektrostatischen Potential (b) und die zugehörigen UV-Spektren (in Ethanol) (c).^[88]

Für die Realisierung des Ziels, die FimH-Bindungstasche chemisch zu markieren und mit Hilfe dieser Markierung im Anschluss photochemisch zu kontrollieren, wurden trifunktionelle FimH-Liganden entworfen. Diese bestehen aus einer Mannoseeinheit und einer endständigen Epoxidfunktion, welche über ein photoschaltbares Azobenzolderivat miteinander verknüpft sind. Die Markierung des Lektins erfolgt nach der Komplexbildung der Mannoseeinheit in der FimH-Bindungstasche (Abb. 42). Während der Photoschalter in seiner längeren *trans*-Form vorliegt, wird die reaktive Epoxidfunktion durch die reversible Bindung des Liganden auf der Proteinoberfläche so vorpositioniert, dass eine möglichst geringe Anzahl an nukleophilen Reaktionspartnern aus der Proteinstruktur zur Verfügung steht. Ein Nukleophil öffnet anschließend das Epoxid, woraufhin der photoschaltbare Ligand kovalent an das Protein gebunden wird, während das Mannosid idealerweise in der Bindungstasche komplexiert vorliegt.

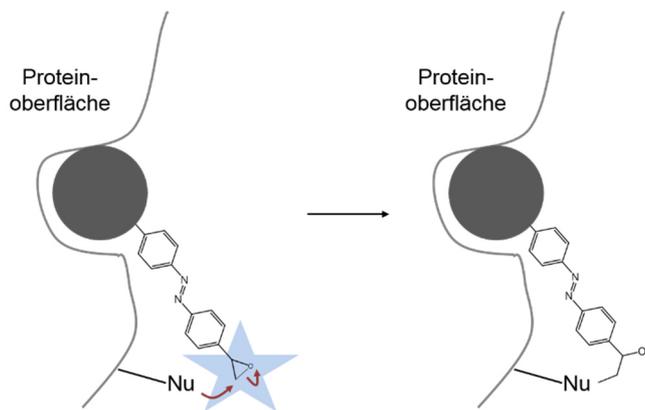


Abb. 42: Photoschaltbare FimH-Liganden können mit einer reaktiven Epoxidfunktion ausgestattet werden, die nach der Komplexierung des Mannosids in der FimH-Bindungstasche eine kovalente Bindung zu einem Nucleophil der Proteinoberfläche ausbildet

Die photochemische Kontrolle der FimH-Funktion kann anschließend wie folgt gelingen (Abb. 43): Durch Bestrahlung des markierten Lektins wird die Isomerisierung des Photoschalters erzielt. Beim Übergang der Azobenzoleinheit in die kürzere *cis*-Konfiguration wird der Ligand durch die Änderung der Molekülgeometrie aus der Bindungstasche gezogen. Eine Rückisomerisierung in die *trans*-Konfiguration ermöglicht wieder eine Komplexierung des Liganden in der Bindungstasche. So wird die Möglichkeit geschaffen, die Bindungstasche unter photochemischer Kontrolle für die Bindung weiterer Liganden gezielt zu öffnen bzw. zu verschließen.

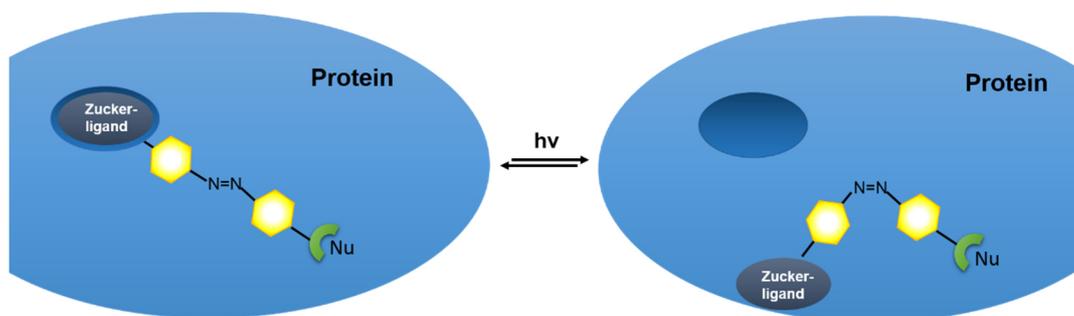


Abb. 43: Photochemische Schaltung der FimH-Funktion. Durch die Bestrahlung des Kohlenhydratliganden und der daraus resultierenden *trans/cis*-Isomerisierung wird der Ligand aus der Bindungstasche bewegt. Durch die Rückisomerisierung wird die Komplexierung wieder ermöglicht. Die bestehende Funktion des Proteins kann somit photochemisch kontrolliert bzw. gezielt aktiviert und inaktiviert werden.

Das Potential, der nach den Anforderungen des Konzepts entworfenen photoschaltbaren Liganden (Abb. 44), wurde vor der Synthese durch Docking-Studien ermittelt. Im Fall des Azobenzolmannosids **25** ist die Azobenzoleinheit direkt an die anomere Position des Kohlenhydrats gebunden, wohingegen in der Struktur von Ligand **26** und **27** die Kohlenhydrat-

von der Azobenzoleinheit durch einen Amidspacer getrennt werden. Dabei wurde **27** als ein unreaktives Analogon von **26** gewählt, welches als Referenzsubstanz für Tests benötigt wird. Vor der Synthese der Mannoside wurde deren Potential in Docking-Studien untersucht.

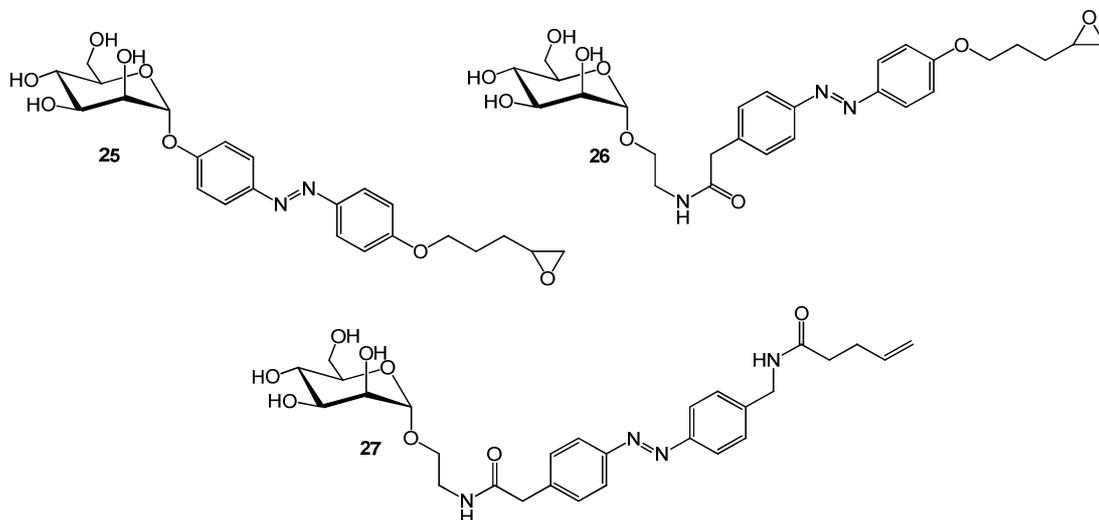


Abb. 44: Photoschaltbare FimH-Liganden.

3.2.1 Docking der photoschaltbaren FimH-Liganden

Es ist wichtig, einen Eindruck von der Affinität der Liganden für die FimH-Bindungstasche zu erhalten. Eine starke Bindung des Liganden ist in zweierlei Hinsicht erforderlich. Zum einen muss der Ligand möglichst lange in der FimH-Bindungstasche komplexiert sein, damit die Markierungsreaktion spezifisch stattfindet. Zum anderen ist der Verschluss der Bindungstasche in der *trans*-Konfiguration umso effektiver, je affiner der Ligand bzw. je stabiler der Ligand-FimH-Komplex ist.

Die Affinität der Liganden zu FimH wurde mit Hilfe von Docking-Studien mit dem Programm *Glide*^[89] untersucht. Für alle drei Strukturen **25-27** wurde mit *Maestro*^[23] eine 3D-Struktur erstellt, welche mit *MacroModel*^[90] in einem Kraftfeld energieminiert wurde. Von jedem Liganden wurden anschließend mit *LigPrep*^[91] verschiedene Konformere erstellt, welche in die Bindungstasche gedockt wurden. Alle Rechnungen wurden für die *closed* und *open gate*-Kristallstruktur des FimH durchgeführt, welche sich lediglich in der Konformation des Tyrosin-Tors (TYR48 und TYR137) am Eingang der Bindungstasche unterscheiden (Kapitel 1.2). Aus der Kraftfeldmethode wurden Docking-Scores erhalten, welche mit der Bindungsaffinität der Liganden zum Protein korrelieren (Tab. 5). Je negativer der Wert des Scores ausfällt, desto

stärker ist die Bindung. Die Dockingergebnisse legen nahe, dass alle Liganden **25-27** sehr gut in die Bindungstasche binden. Durch die aromatischen π - π -Wechselwirkungen der Azobenzoleinheiten mit dem Tyrosin-Tor werden die Scoring-Werte zusätzlich gesteigert. Im Fall der *open gate*-Struktur befindet sich die Azobenzoleinheit bei allen Liganden zwischen den beiden Tyrosinresten, wohingegen sie sich in der *closed gate*-Struktur um das TYR48 herum ausrichtet (Abb. 45).

Tab. 5: Docking-Scores der photoschaltbaren Liganden **25-27** für die *closed* und *open gate*-Kristallstruktur von FimH. Als Referenz wurden die Werte für Methyl- α -D-mannopyranosid (MeMan) und *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid (*p*NPMan) berechnet.

Ligand	Scoring-Wert <i>closed gate</i> -Struktur	Scoring-Wert <i>open gate</i> -Struktur
25	- 9.32	- 9.15
26	- 8.98	- 9.79
27	- 9.50	- 9.27
MeMan	- 8.50	- 8.23
<i>p</i> NPMan	- 9.23	- 9.00

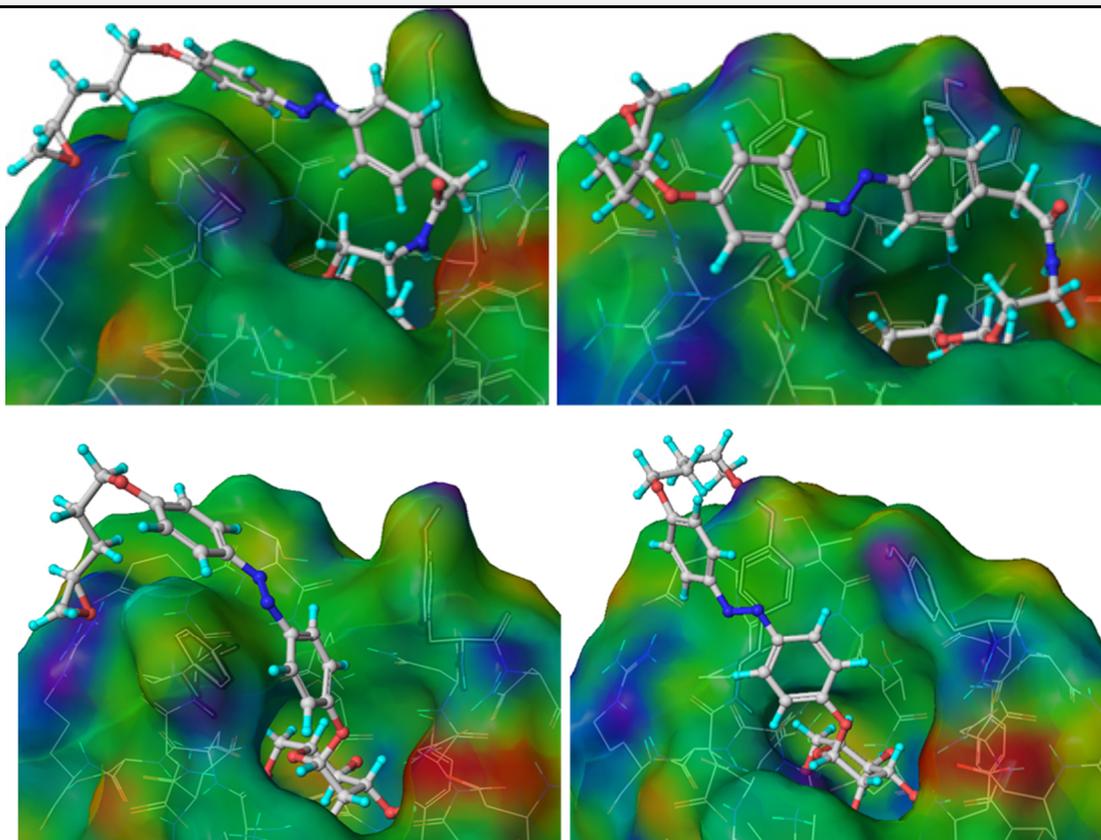


Abb. 45: Connolly-Darstellung^[22] der FimH-Bindungstasche mit gebundenem Ligand **25** (oben) und **26** (unten) in der *open* und *closed gate*-Form. Dargestellt ist jeweils die Struktur mit dem niedrigsten Scoring-Wert (**25**: -9.15; -9.32), (**26**, -9.79; -8.98). Die molekulare Oberfläche ist gemäß dem elektrostatischen Potential gefärbt.

Ungeachtet des Größenunterschieds der Mannoside **25** gegenüber **26** sind die Azobenzoleinheit und das Epoxid in **25** und **26** recht ähnlich positioniert. Grund dafür ist offenbar die gewinkelte Struktur des Liganden **26** (Abb. 46).

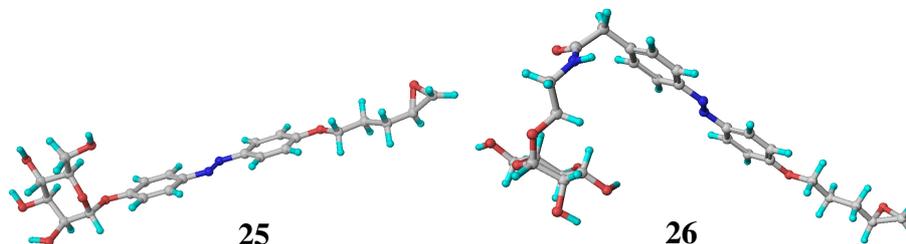


Abb. 46: 3D-Strukturen der Epoxidliganden **25** und **26**. Die Struktur von **25** ist gestreckt, wohingegen **26** einen Knick aufweist.

Eine genauere Betrachtung der Bindung ergibt sich aus den Ligand-Interaktionsdiagrammen, welche die nähere Proteinumgebung des Liganden darstellen (Abb. 47, 48). Bei Ligand **26** koordiniert die Epoxidfunktion in der *open gate*-Struktur an ARG98, was die Bindung zusätzlich stärkt. In näherer Umgebung des Epoxids ist neben dem Arginin in beiden Kristallstrukturen nur noch die Aminosäureseitenkette der GLU50 positioniert. Beide Aminosäuren, die sich in der Nähe des komplexierten Liganden **26** befinden (ARG98, GLU50) enthalten jedoch keine für die Spaltungsreaktion geeigneten nukleophilen Funktionalitäten. Im Fall von Ligand **25** dagegen koordiniert die Epoxidfunktion in beiden Kristallstrukturen an einen Aminosäurerest (Abb. 47). In der *open gate*-Struktur findet die Wechselwirkung wie bei Ligand **26** mit ARG98 statt, bei der *closed gate*-Kristallstruktur dagegen koordiniert das Epoxid an die Hydroxygruppe des TYR48. Die Affinität der beiden Liganden ist vergleichbar gut, aber das Markierungspotential in Anbetracht der umliegenden Aminosäuren scheint für den kürzeren Liganden **25** höher zu sein. Aufgrund der großen Ähnlichkeit beider Liganden in Bindungsaffinität und Lage des Aglycons wurde neben dem Referenzligand **27** lediglich das Mannosid **25** für die Synthese ausgewählt, der in Hinblick auf eine erfolgreiche Markierung des Proteins ein geringfügig besseres Ergebnis zeigt als der Ligand **26**. Wird in zukünftigen Projekten die Verwendung eines größeren Liganden angestrebt, empfiehlt sich die Verlängerung der Alkylkette am Epoxid gegenüber der an der Mannoseeinheit. Der Einbau einer Etherfunktion innerhalb der Alkylkette könnte hierbei zusätzlich eine Steigerung der Wasserlöslichkeit bewirken. Allerdings ist es auch wichtig, die Struktur des Liganden nicht zu flexibel zu gestalten, damit durch die Schaltung der Azobenzoleinheit in die *cis*-Konfiguration die Mannoseeinheit bewegt werden kann.

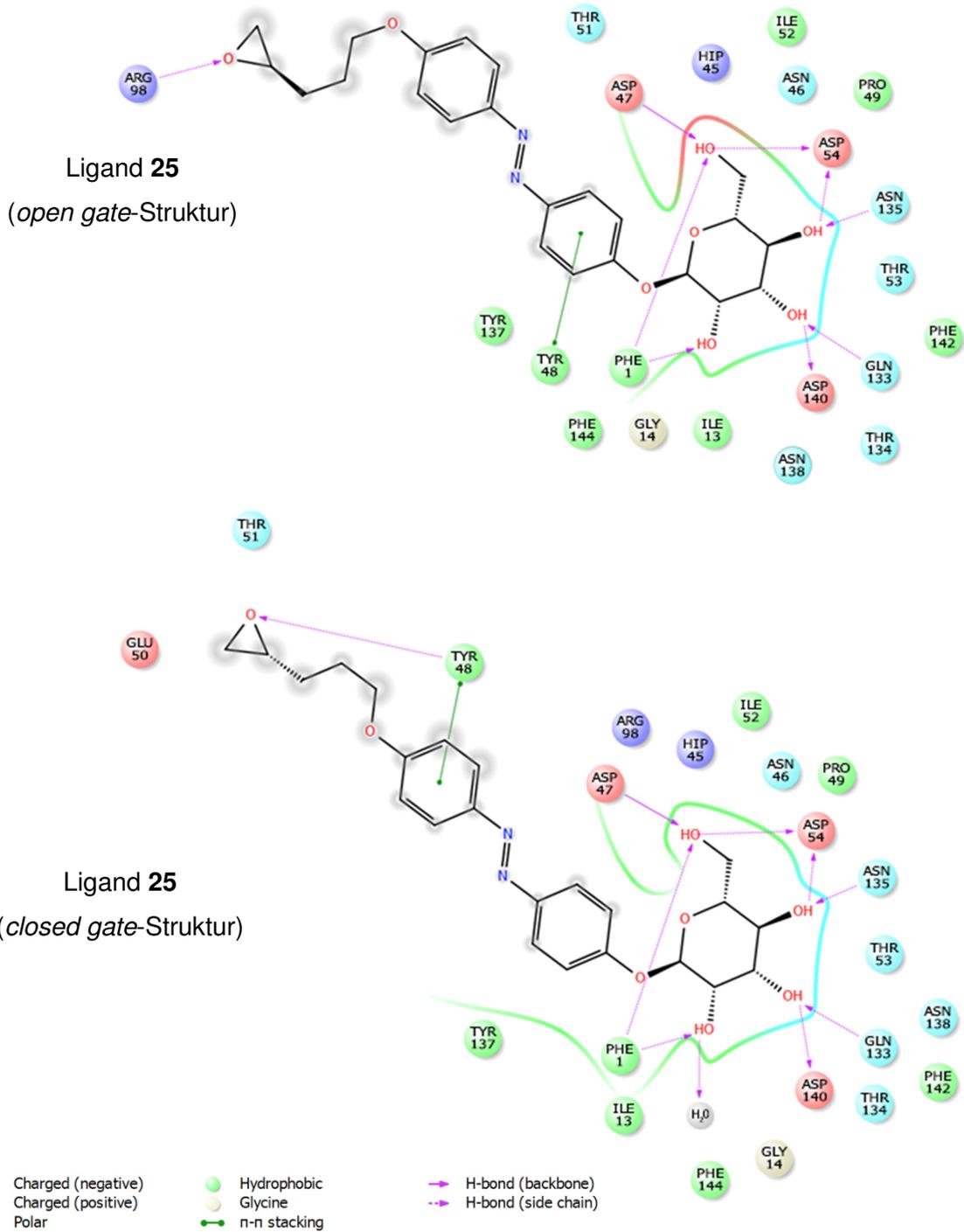


Abb. 47: Ligand-Protein-Interaktionsdiagramme des gedockten Epoxidliganden **25** für die *open gate*-(oben) und *closed gate*-(unten) Kristallstruktur von FimH.

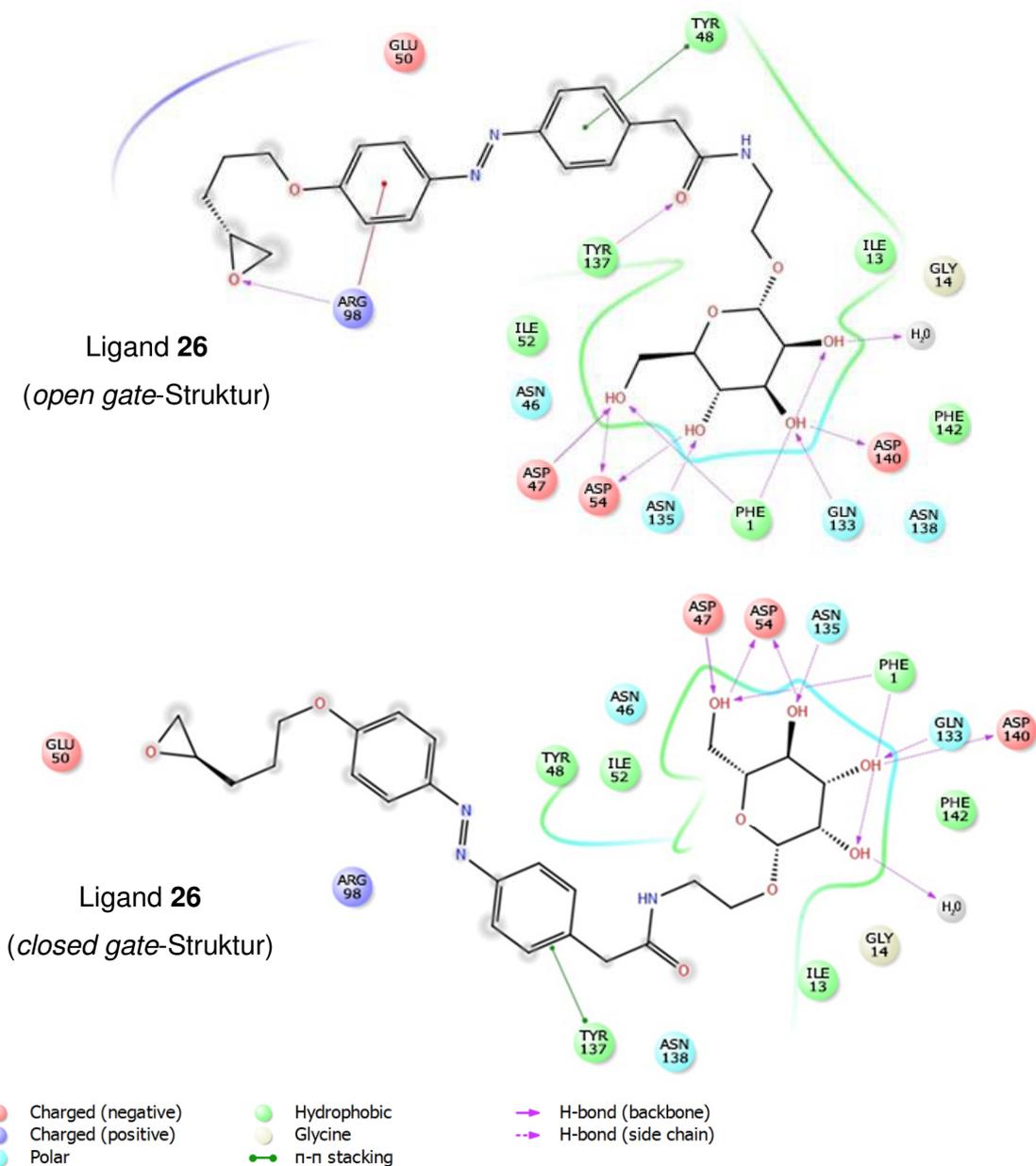


Abb. 48: Die Abbildung zeigt alle Wechselwirkungen, die der Ligand **26** während der Komplexierung in die FimH-Bindungstasche eingeht. Dargestellt wurde jeweils die aus dem Docking erhaltene Beststruktur für die *open gate*- (oben) und die *closed gate*-Form (unten) von FimH.

3.2.2 Synthese der photoschaltbaren Liganden

Für die Synthese des Liganden **25** wird zunächst das Gycoazobenzol **32** benötigt. Dieses kann entweder ausgehend von Dihydroxyazobenzol (**31**) oder von *p*-Nitrosophenylmannosid **28** dargestellt werden (Abb. 49).^[92-93]

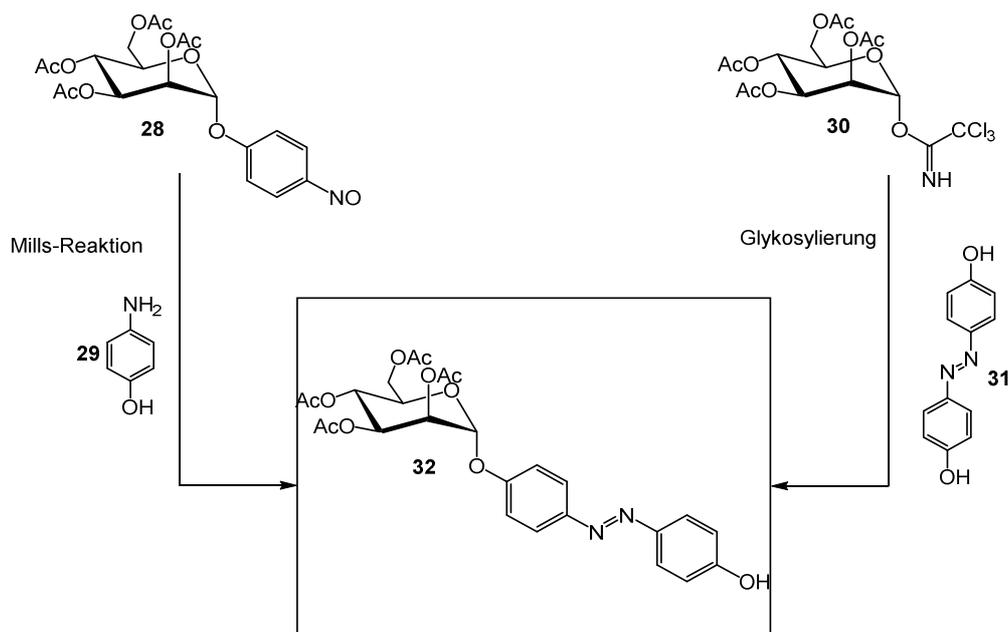


Abb. 49: Mögliche Synthesewege zum *p*-Hydroxyazobenzolglycosid **32**.

Bei der Glycosylierung von **31** kann sich allerdings neben dem Produkt auch das zweifach glycosylierte Nebenprodukt bilden. Deshalb wurde zunächst eine Synthese ausgehend von *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid (**2**) begonnen, das nach Acetylierung der Zucker-Hydroxygruppen und anschließender Reduktion der Nitrofunktion zur Nitrosoverbindung **28** umgesetzt wurde. In der darauffolgenden Mills-Reaktion mit 4-Aminophenol (**29**) wurde das Azobenzolglycosid **32** dargestellt (nicht gezeigt). Die Azokondensation lieferte in diesem Fall aber nur eine sehr geringe Ausbeute, weshalb ein anderer Syntheseweg eingeschlagen wurde (Abb. 50).

Ausgehend von Amin **19** wurde ein Diazoniumion generiert, welches in einer Azokupplung mit Phenol zum Azobenzolderivat **34**^[92] überführt wurde. Dieser Weg ist kürzer als die bisher diskutierten und mit einer höheren Ausbeute von 62 % insgesamt effizienter. Zur Herstellung des Zielmoleküls **25** wurde 1-Brompenten (**35**) zunächst mit *meta*-Chlorperbenzoesäure nach einer Literaturvorschrift^[94] zum Epoxid **36** umgesetzt.^[95] Die Reaktion wurde wässrig aufgearbeitet und das Produkt als Rohprodukt in einer Williamson-Ethersynthese in *N,N*-Dimethylformamid und Kaliumcarbonat als Base umgesetzt. Das Epoxid-funktionalisierte photoschaltbare Mannosid **25** konnte so in einem kurzen und effizienten Syntheseweg dargestellt werden.

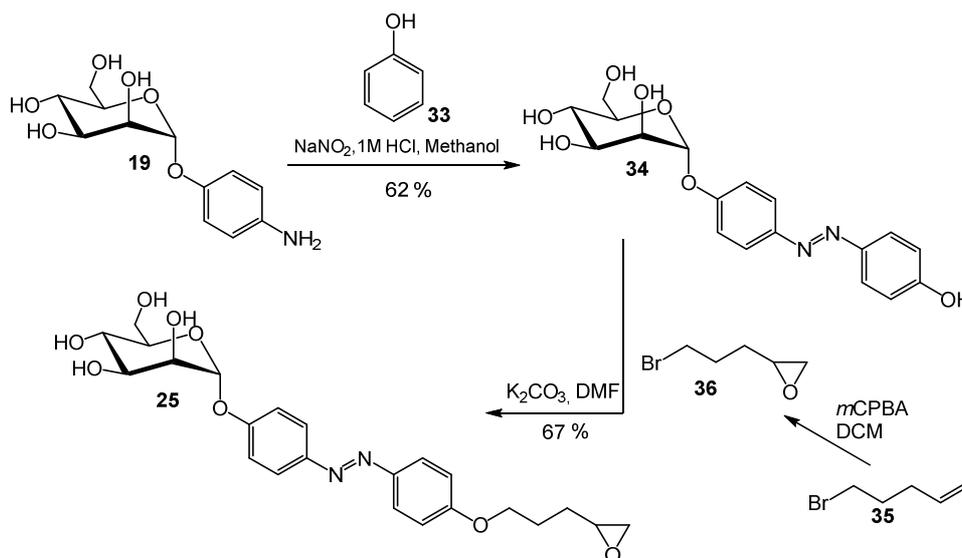


Abb. 50: Syntheseweg zur Darstellung des photoschaltbaren Liganden **25**.

Die Synthese des photoschaltbaren Mannosids **27** wurde mit der Darstellung eines bifunktionalen Azobenzolderivats **39** begonnen, welches, mit einer Amino- und einer Säurefunktion ausgestattet, orthogonal funktionalisiert werden kann. Diese oft als photoschaltbare Aminosäuren bezeichneten Chromophore sind in der Literatur in einigen Abwandlungen bekannt und werden zum Beispiel in Peptide eingebaut.^[96-98] Die Azokondensation erfolgte nach Mills mit einer Amin- und einer Nitrosokomponente (Abb. 51). Ausgehend von 4-Nitrobenzylamin-Hydrochlorid (**33**) wurde zunächst die primäre Aminofunktion der Verbindung mit Fmoc-Chlorid geschützt. Daraufhin wurde die Nitrofunktion mit Wasserstoff unter Verwendung von Palladium auf Kohlenstoff als Katalysator zum Amin **35** reduziert. Parallel dazu wurde 4-Nitrophenyllessigsäure (**36**) mit *tert*-Butanol verestert. Aus der geschützten Nitrokomponente **37** wurde anschließend mit Zink und Eisenchlorid die Nitrosoverbindung **38** dargestellt, welche als Rohprodukt in der Azokondensation mit dem Amin **35** in Eisessig umgesetzt wurde. So wurde das orthogonal geschützte Azobenzolderivat **39** erhalten, welches eine gezielte Funktionalisierung in beiden *para*-Positionen erlaubt. Anschließend wurde die Aminofunktion von **39** basisch mit Piperidin entschützt und mit 4-Pentensäurechlorid (**45**) zum Amid umgesetzt. Das so funktionalisierte Azobenzolderivat **41** konnte in einer Ausbeute von 82 % erhalten werden. Im nächsten Schritt wurde der *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure gespalten. Die freie Säure **47** konnte daraufhin in einer Kupplungsreaktion mit HATU und dem literaturbekannten Aminoethylmannosid **48**^[99-100] umgesetzt werden.

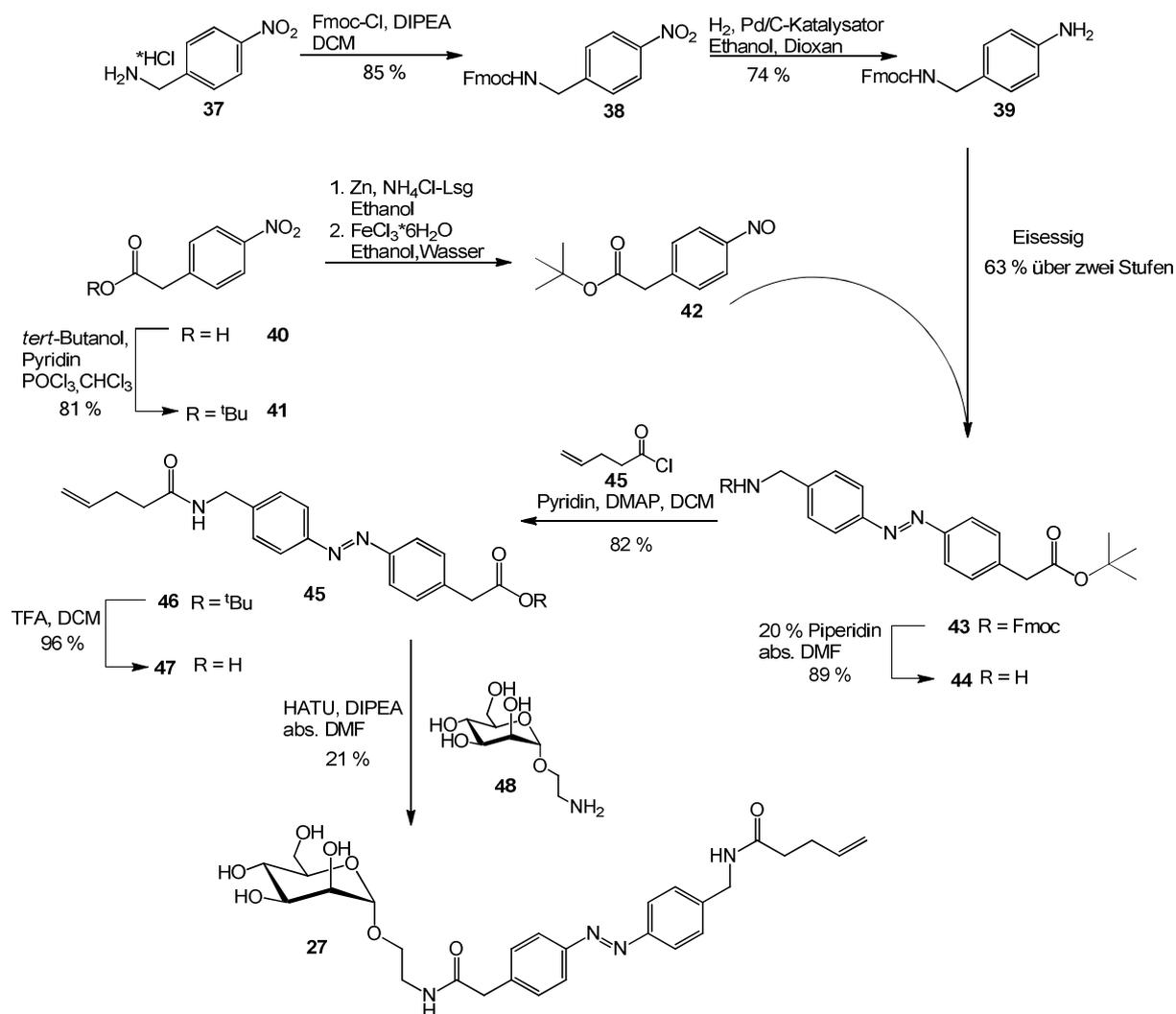


Abb. 51: Synthese des photoschaltbaren Mannosids 27.

Innerhalb dieses Teilprojektes gelang die Synthese der beiden photoschaltbaren Mannoside 25 und 27. Für das Epoxid 25 wurde dabei ein kurzer und effizienter Syntheseweg gefunden. Die Synthese des Referenzliganden 27 lieferte außerdem ein interessantes, orthogonal funktionalisierbares Azobenzolderivat, das auch in anderen Teilen dieser Arbeit noch Anwendung findet (vgl. Kapitel 3.3.3). Die biologischen Tests unter Verwendung der dargestellten photoschaltbaren Moleküle stehen noch aus. Jedoch ist vor allem auch durch das sorgfältige Design und die damit einhergehende theoretische Betrachtung des Potentials der Liganden der Grundstein gelegt worden, um dieses Teilprojekt und damit die Schaltung der FimH-Funktion zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

3.3 Verwendung einer DMAP-vermittelten Ligationsstrategie zur Modifizierung des bakteriellen Lektins FimH

Reversibilität und Schaltung ausgewählter molekularer Prozesse in verschiedensten (bio)chemischen Zusammenhängen erlangt immer mehr an Bedeutung in den Naturwissenschaften. Besonders in der Biologie sind irreversible Vorgänge selten. Zyklische Prozesse und Austauschreaktionen sowie reversible Wechselwirkungen bestimmen die molekularen Abläufe in lebenden Organismen. Funktionen von Proteinen gezielt ausschalten zu können, kann einerseits eine an einem Ort unerwünschte Reaktion im Körper stoppen, könnte aber auch an anderer Stelle zu Nebenwirkungen führen. So kann eine Behandlung mit Antibiotika nicht nur schädliche Bakterien angreifen, sondern auch die, die unserem Körper nutzen. Eine zeit- und ortsabhängige Schaltung der bakteriellen Adhäsion könnte in diesem Zusammenhang die Therapie bakterieller Infektionen revolutionieren.

Ein Schritt in diese Richtung ist der Versuch, die Funktion eines Lektins zu schalten. FimH als Modellsystem trägt die adhäsive Einheit, welche die bakterielle Adhäsion von *E. coli*-Bakterien an die Zelloberfläche ermöglicht. Wenn man nun das Lektin FimH spezifisch an der Kohlenhydrat-Bindungstasche mit einem funktionellen Molekül modifizieren könnte, ließe sich die Funktion des Lektins durch einen entsprechenden Stimulus an- und ausschalten. Eine geeignete Methode für diese Idee zu finden, ist Teil des wichtigsten Teilprojektes dieser Dissertation. In den letzten Jahren wurden zahlreiche bioorthogonale Reaktionen für die Markierung von Lektinen entwickelt. Eine gezielte Funktionalisierung an der Bindungstasche des gewählten Proteins ohne die Einführung artifizieller Aminosäuren war vor allem durch die Verwendung affinitätsbasierter Methoden möglich, bei denen die reaktive Gruppe an einen Liganden gebunden ist.^[28] In den meisten Fällen geht hierbei mit der Markierung aber auch ein Funktionsverlust der Lektine einher. Will man daher die Proteinfunktion intakt halten, so muss der Ligand nach erfolgter Markierung entfernt werden. HAMACHI *et al.*^[28, 51] entwickelten nach dieser Anforderung mehrere affinitätsgesteuerte Ligationsstrategien, die eine chemische Modifikation von Proteinen an ihrer aktiven Stelle ermöglichen, nach der dann anschließend der Ligand beseitigt werden kann (Kapitel 1.3). Aufgrund ihres großen Erfolgs bei der spezifischen Markierung von Lektinen mit Hilfe der DMAP-gesteuerten Ligationsreaktion wurde diese für die affinitätsbasierte Modifizierung von FimH angewandt. Kernpunkt dieser Methode ist eine DMAP-katalysierte Acyltransferreaktion. DMAP ist ein häufig verwendeter Katalysator für Veresterungen.^[101] Mannosidliganden, die mit einem DMAP-Derivat funktionalisiert sind, werden in diesem Zusammenhang als Transferkatalysatoren dienen,

welche die Modifizierung spezifisch an die Bindungstasche steuern. Der Acyldonor, welcher an das Protein gebunden wird, kommt in Form eines Thioesters in die Reaktion. Die zentrale Idee ist dabei, ein Schaltermolekül am Eingang der Bindungstasche als eine Art *gate keeper* zu befestigen, der einen reversiblen, durch Licht gesteuerten Verschluss der Bindungstasche ermöglicht. Azobenzole eignen sich hervorragend als solche Schalter aufgrund ihrer gut untersuchten und effizienten Schalteigenschaften (Kapitel 3.2).^[84] In Abb. 52 ist der Reaktionsablauf für die Modifizierung von FimH im Detail illustriert. Der DMAP-funktionalisierte Kohlenhydratligand wird zunächst mit dem Protein inkubiert. Im nächsten Schritt wird ein Azobenzolderivat in Form eines Thioesters hinzugegeben. Der Stickstoff im Pyridin-Ring greift dabei am Carbonylkohlenstoffatom des Thioesters an, woraufhin das Azobenzol an den DMAP-Liganden gebunden wird. Diese reaktive Zwischenstufe wird unmittelbar danach durch ein in der Nähe befindliches Nukleophil wie einer Hydroxyl- oder Aminogruppe im Protein gespalten, so dass das Azobenzolderivat in Nähe der Bindungstasche gebunden ist. Der nicht kovalent gebundene Ligand wird anschließend durch Waschen entfernt. Die Bestrahlung des modifizierten Proteins wird nun die *trans/cis*-Isomerisierung der Azobenzoleinheit auslösen, mit dem Ziel, die Bindungstasche sterisch zu verschließen und somit die Bindung von Mannosidliganden an FimH verhindern zu können. Durch erneute Bestrahlung mit einer geeigneten Wellenlänge und dem Übergang der Azobenzoleinheit von der *cis*- in die *trans*-Konfiguration wird die Blockierung rückgängig gemacht.

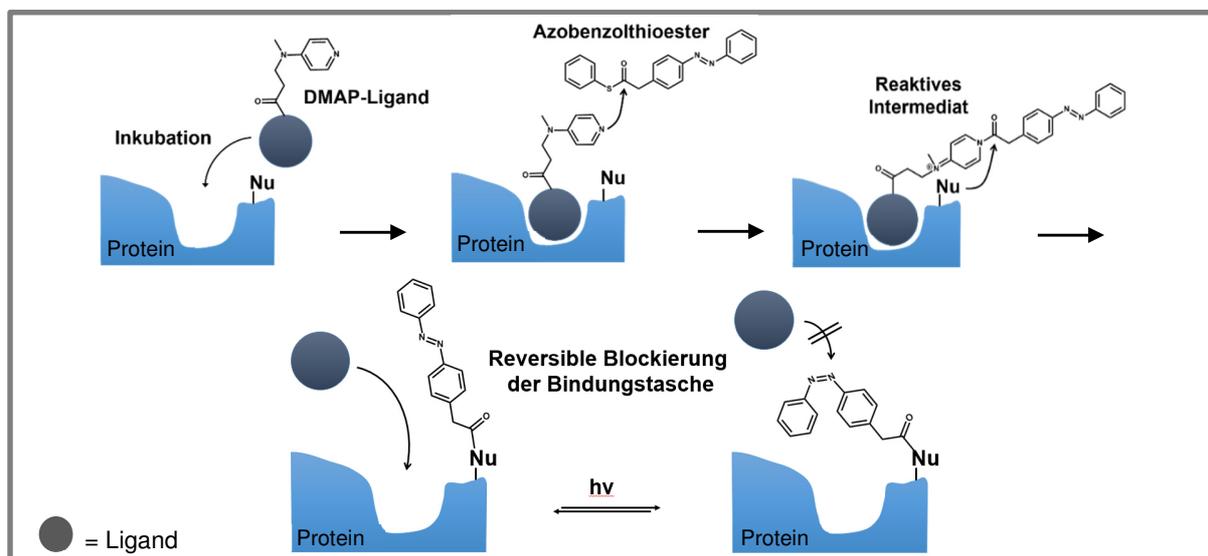


Abb. 52: DMAP-katalysierte Funktionalisierung von FimH. Der DMAP-Ligand wird mit dem Protein inkubiert, anschließend wird das Azobenzolderivat in Form eines Thioesters zugegeben. Die entstandene aktivierte Zwischenstufe wird durch einen nukleophilen Angriff von der Proteinoberfläche gespalten, so dass das Azobenzolderivat kovalent an die Proteinoberfläche gebunden ist und dort durch *cis/trans*-Isomerisierung den Zugang zur Bindungstasche kontrolliert.

Damit diese Projektidee realisiert werden kann, müssen zunächst DMAP-funktionalisierte Mannosidliganden ausgewählt werden, die eine hohe Affinität zur Protein-Bindungstasche aufweisen. Als zweites ist es wichtig, dass sich ein Nukleophil aus einer Aminosäureseitenkette des Proteins in der Nähe des zu spaltenden Aktivesters befindet. Die molekularen Eigenschaften des Azobenzolderivats machen einen weiteren sehr entscheidenden Faktor aus. Es muss sterisch in der Lage sein, die Bindungstasche in seiner *cis*-Form zu blockieren und sich dabei in Richtung der Bindungstasche ausrichten. Außerdem spielt die Löslichkeit der eingesetzten Verbindungen für biologische Anwendungen immer eine wichtige Rolle.

Zwei verschiedene DMAP-Liganden und vier Azobenzolthioester wurden zum Zweck der Modifikation von FimH entworfen. Die Mannoside **50** und **51** unterscheiden sich in der Art, dass Mannosid **51** einen zusätzlichen aromatischen Ring im Aglycon aufweist (Abb. 53). Aromatische Reste können durch zusätzliche hydrophobe oder π - π -Wechselwirkungen zu einer Steigerung der FimH-Affinität führen.

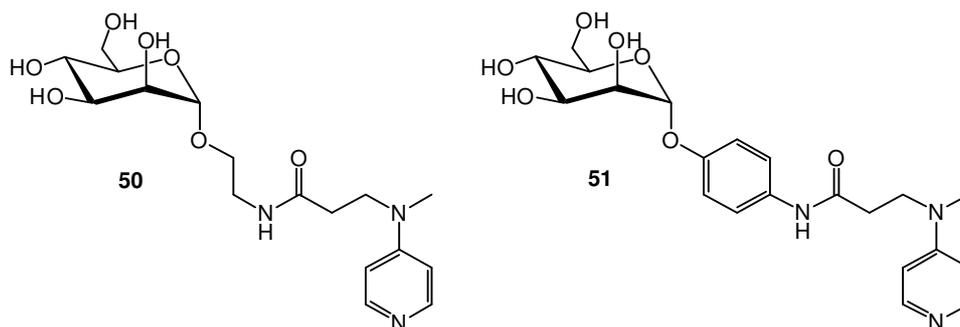


Abb. 53: Als Liganden wurden die DMAP-funktionalisierten Mannoside **50** und **51** ausgewählt. Ligand **51** trägt einen zusätzlichen Phenylring, der zu einer Steigerung der Bindungsaffinität führen soll.

Die ausgewählten Azobenzolthioester **52-55** sind am äußersten Phenylring der Azobenzoleinheit unterschiedlich substituiert, wodurch sie sich in ihrem sterischen Volumen und in ihrer Polarität stark voneinander unterscheiden (Abb. 54). Für die Veresterung wurde jeweils Thiophenol ausgewählt, da die Thiophenylester in den Arbeiten von HAMACHI *et al.* die höchste Reaktivität zeigten.^[51]

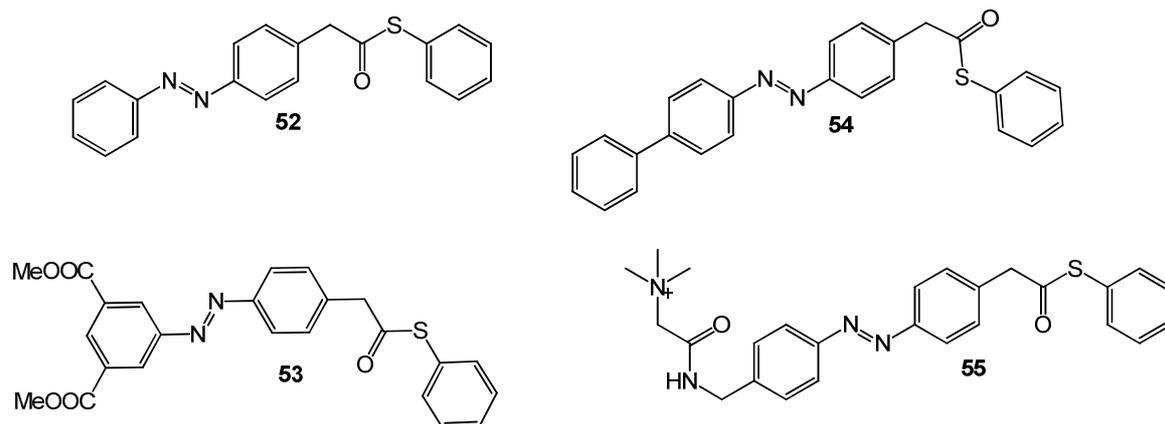


Abb. 54: Vier Azobenzothioester wurden konzipiert. Sie unterscheiden sich durch Substituenten am äußeren Phenylring der Azobenzoleinheit, wodurch ihre sterischen bzw. polaren Eigenschaften variiert sind.

3.3.1 Docking der DMAP-funktionalisierten Mannosidliganden

Für eine erfolgreiche Modifizierung des Lektins FimH an der Bindungsstelle ist es essentiell, dass die ausgewählten DMAP-funktionalisierten Liganden eine hohe Bindungsaffinität zur FimH-CRD haben. Um die Affinitäten im Vorab abschätzen zu können, wurden Computergestützte Docking-Studien mit *Glide* aus dem Programmpaket Schrödinger durchgeführt.^[89] Dafür wurden die Kristallstrukturen mit den PDB-Codes 1UWF und 1KLF verwendet, die sich lediglich in der Konformation der Tyrosinreste TYR48 und TYR137 unterscheiden (Kapitel 1.2).^[25-26] Da sich diese beiden Reste unmittelbar am Eingang der Bindungstasche befinden, ist deren Ausrichtung für die Affinität des Liganden nicht unerheblich und muss deshalb berücksichtigt werden. Die Mannosidliganden **50** und **51** wurden zunächst als 3D-Struktur gezeichnet und mit *MacroModel* energieminiert (Abb. 55).^[90] Anschließend wurden mit *LigPrep* verschiedene Konformere der Liganden bei neutralem pH-Wert erstellt.^[91]

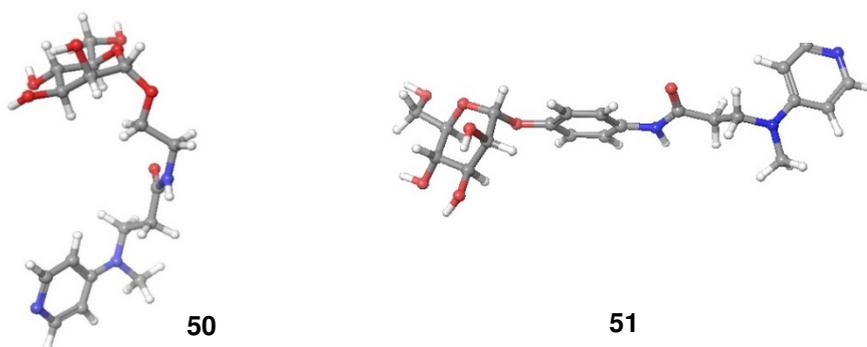


Abb. 55: 3D-Strukturen der DMAP-Liganden **50** und **51**.

Der pH-Wert spielt bei diesen Verbindungen eine Rolle, da das Stickstoffatom des Pyridinrestes mit einem pKa-Wert von 5.2 im sauren Bereich protoniert vorliegt, wodurch unterschiedliche Wechselwirkungen mit FimH und damit unterschiedliche Affinitäten resultieren. Es zeigte sich, dass beide Liganden eine hohe Affinität zur FimH-CRD aufweisen. Die α -Mannose-Einheit komplexiert in die Bindungstasche, wobei das Aglycon wie erwartet in Richtung des Tyrosin-Tores zeigt und durch π - π -Wechselwirkungen die Bindung verstärkt. Die bei den Rechnungen erhaltenen Docking-Scores sind in Tab. 6 aufgeführt. Die Werte korrelieren mit der Bindungsaffinität der Liganden. Je negativer der Wert ist, desto stärker ist die Affinität des Liganden. Zum Vergleich der Werte wurden die Docking-Scores der gut bekannten Standardinhibitoren Methyl- α -D-mannosid (MeMan) und *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (*p*NPMan) (**2**) berechnet. Beide DMAP-Liganden liegen im Affinitätsbereich von *p*NPMan **2**, welches als guter FimH-Antagonist bekannt ist. Ligand **51** ist wie vermutet durch seinen zusätzlichen aromatischen Rest der bessere Inhibitor gegenüber **50**, was auf zusätzliche π - π -Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

Tab. 6: Übersicht der mit *Glide* berechneten Scoring-Werte für die Liganden **50** und **51** im Vergleich zu Methyl- α -D-mannosid (MeMan) und *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (*p*NPMan) (**2**).

Verbindung	Scoring-Wert	Scoring-Wert
	<i>open gate</i> -Struktur	<i>closed gate</i> -Struktur
MeMan	- 8.23	- 8.50
<i>p</i> NPMan	- 9.00	- 9.23
50	- 9.13	- 9.09
51	- 9.06	- 9.51

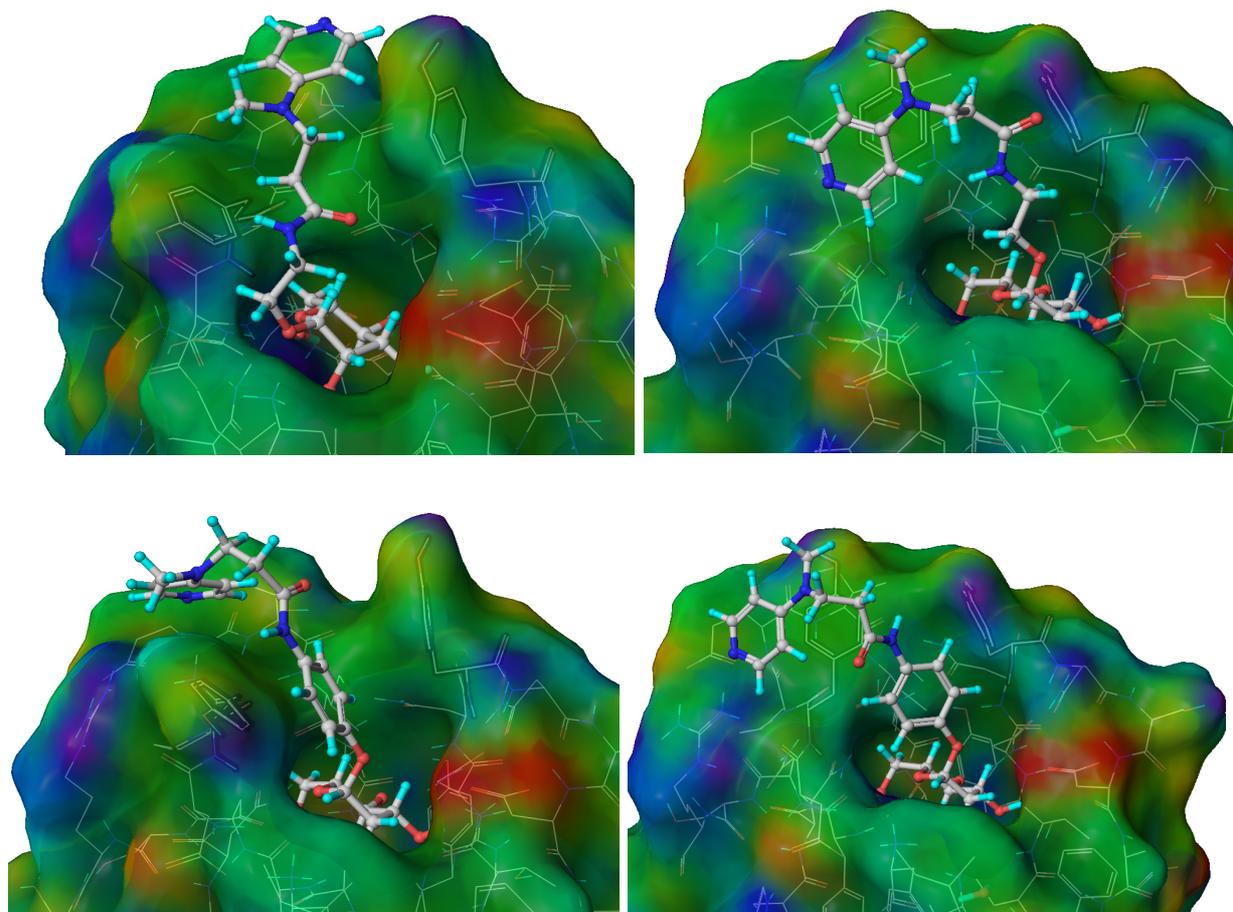


Abb. 56: Connolly-Darstellung^[22] der FimH-CRD mit gedocktem Liganden **50** (oben) und **51** (unten). Die Oberfläche ist nach dem elektrostatischen Potential gefärbt, wobei rot negative, blau positive und grün neutrale Bereiche darstellen. Das linke Bild zeigt jeweils das Ergebnis für die *open gate*-Struktur (1KLF), auf dem rechten Bild ist das Ergebnis der *closed gate*-Struktur (1UWF) zu sehen (Scoring-Werte: -9.13/-9.09 (**50**); -9.06/-9.51 (**51**)).

3.3.2 Synthese und Testung zweier DMAP-funktionalisierter Mannosidliganden

Für die Synthese der Mannoside **50** und **51** wurde das jeweilige Mannosid durch eine Peptidkupplungsreaktion mit einem entsprechenden DMAP-Derivat verbunden. Nach einer Synthesevorschrift von BHATTACHARYA *et al.*^[102] wurde dazu das Carboxy-funktionalisierte DMAP-Derivat **58** in zwei Stufen dargestellt (Abb. 57). Ausgehend von 4-Methylaminopyridin (**56**) wurde in einer Michael-analogen Reaktion mit Methylacrylat der Methylester **57** erhalten. Im darauf folgenden Schritt wurde der Ester **57** unter basischen Bedingungen mit Natriumhydroxid gespalten und das Säure-funktionalisierte, wasserlösliche DMAP-Derivat **58** in einer Ausbeute von 86 % erhalten. Die für die Kupplung verwendeten Amin-

funktionalisierten Mannoside **19**^[81] und **48**^[99] wurden analog zur Literatur dargestellt. Beide Komponenten wurden anschließend jeweils in einer Kupplungsreaktion mit HATU unter Zugabe von DIPEA zu den entsprechenden DMAP-funktionalisierten Mannosiden **50** und **51** umgesetzt. Aufgrund der hohen Polarität der Verbindungen war eine Aufreinigung nicht trivial. Durch mehrmalige Säulenchromatographie an Normal- sowie Umkehrphase konnten beide Produkte aber schließlich rein erhalten werden.

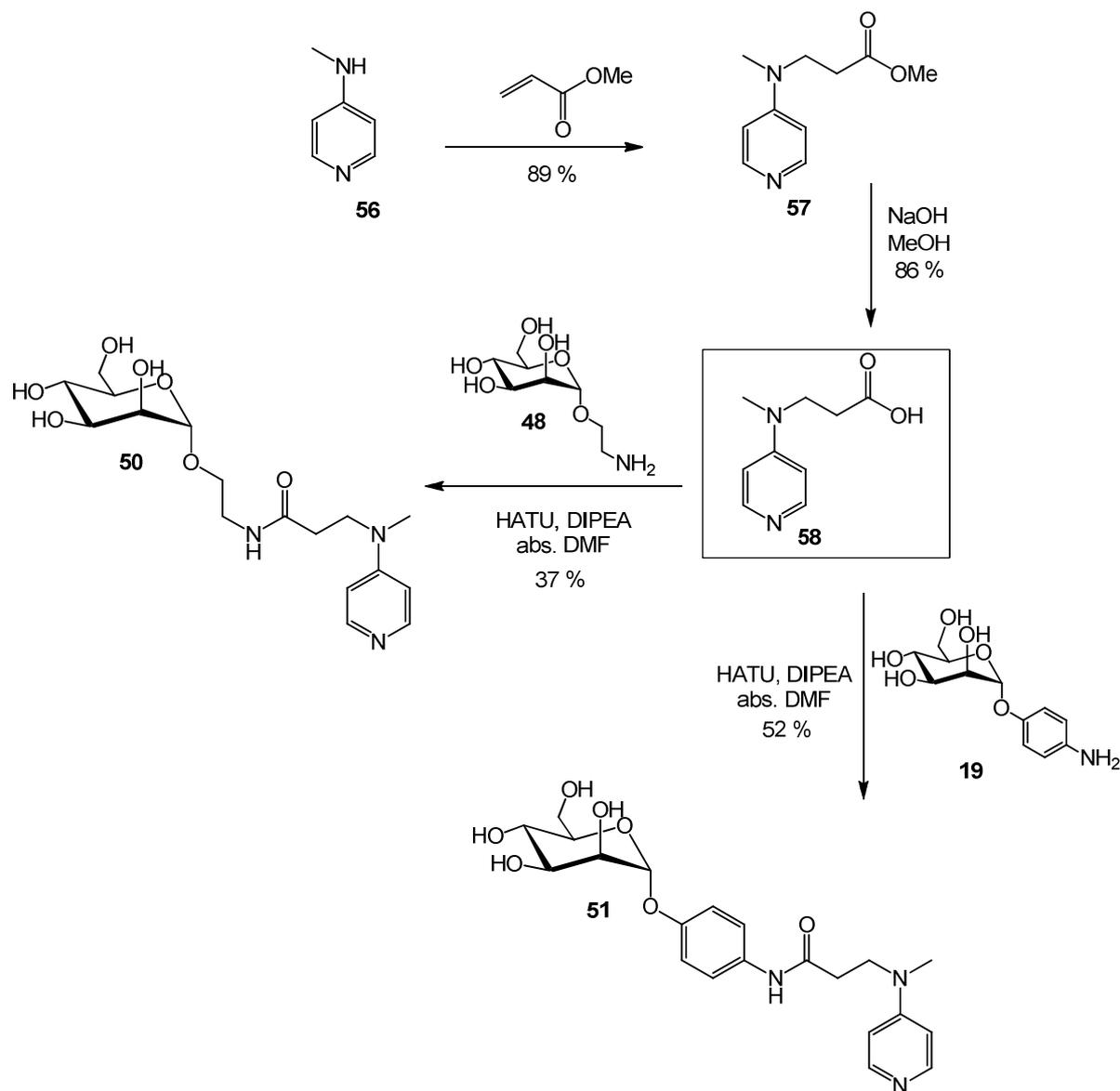


Abb. 57: Synthese der DMAP-funktionalisierten Mannoside **50** und **51** mit Hilfe des dargestellten DMAP-Derivats **58**.^[102]

Nach der erfolgreichen Synthese der Mannoside **50** und **51** wurde die Bindungsaffinität der Liganden in einem Inhibitionsassay mit GFP-markierten *E. coli*-Bakterien bestimmt.^[103-104] Der verwendete Bakterienstamm pPKL1162 ist gentechnisch so verändert, dass er ausschließlich

Typ-1-Fimbrien exprimiert, welche die Mannose-spezifische Bindung vermitteln. Durch die GFP-Markierung können gebundene Bakterien direkt über die Auslesung mittels eines Fluoreszenz-Readers detektiert werden. Für die Tests wurden 96 *well*-Mikrotiterplatten mit Mannan beschichtet. Anschließend wurden die Stammlösungen der jeweiligen Mannoside zusammen mit der angesetzten Bakteriensuspension in die *wells* pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurde die Fluoreszenz auf der Platte mit dem Fluoreszenz-Reader ausgelesen. Je besser der zugegebene Inhibitor die Bakterien in Lösung bindet, desto weniger Bakterien adhären an die mannosylierte Oberfläche. Die erhaltenen Inhibitionskurven zeigen den erwarteten sigmoidalen Verlauf und lassen die Bestimmung von IC_{50} -Werten zu (Abb. 58). Diese geben die Konzentration des getesteten Inhibitors an, bei der 50 % der bakteriellen Adhäsion inhibiert wurde. Da diese Werte jedoch stark von den experimentellen Gegebenheiten abhängig sind, wurden zudem auch die relativen inhibitorischen Potenzen (RIP) angegeben, welche die ermittelten IC_{50} -Werte in Relation zum Standardinhibitor Methyl- α -D-mannopyranosid (MeMan) setzen und damit besser vergleichbar machen (Tab. 7).

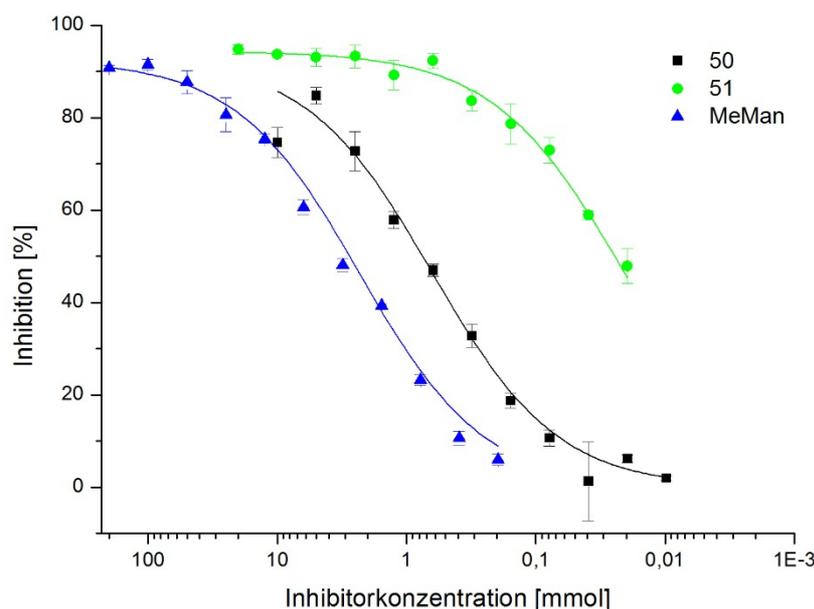


Abb. 58: Inhibitionsassay für die DMAP-funktionalisierten Liganden **50** und **51** im Vergleich zu dem Standardinhibitor α -D-Methylmannosid (MeMan).

Die Docking-Studien ergaben für den Liganden **51** eine höhere Bindungsaffinität zu FimH. Die gemessenen Werte stimmten, den Erwartungen entsprechend, mit den theoretischen Ergebnissen überein. Beide Liganden binden besser als MeMan, wobei der Ligand **51** mit dem

aromatischen Aglycon aufgrund verstärkter π - π -Wechselwirkungen mit den Tyrosinresten am Eingang der Bindungstasche eine höhere Affinität als **50** zeigt. Stellt man die Daten den theoretischen Werten gegenüber, fällt auf, dass die experimentellen Ergebnisse genauer mit den Ergebnissen für die *closed gate*-Kristallstruktur übereinstimmen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, in welcher Konformation sich die beiden Tyrosinreste unter den gegebenen Bedingungen befinden. Beide synthetisierten Liganden sind in hohem Maß wasserlöslich und aufgrund ihrer starken Affinität zu der FimH-Bindungstasche potentiell gut für Ligationsversuche geeignet.

Tab. 7: Darstellung der aus dem GFP-Assay ermittelten IC_{50} -Werte und der berechneten relativen inhibitorischen Potenzen (RIP) für die Liganden **50** und **51** sowie für MeMan. Die Fehlerbalken wurden durch Dreifachbestimmung auf der Platte erhalten. Des Weiteren sind die theoretisch erhaltenen Scoring-Werte zum Vergleich dargestellt.

Inhibitor	RIP	IC_{50} [mM]	Scoring-Wert	
			<i>open gate</i> -Struktur	<i>closed gate</i> -Struktur
MeMan	1	2.78 ± 0.055	- 8.23	- 8.50
50	4	0.794 ± 0.034	- 9.13	- 9.09
51	103	0.027 ± 0.002	- 9.06	- 9.51

3.3.3 Synthese funktionalisierter Azobenzolthioester

Die Acyldonoren, die für die Ligationsreaktion vorgesehen wurden (vgl. Abb. 54), unterscheiden sich bezüglich ihrer sterischen Eigenschaften und ihrer Polarität. Thioester **52** trägt eine einfache, nicht-substituierte Azobenzoleinheit. Thioester **53** ist am äußeren Phenylring der Azobenzoleinheit in beiden *meta*-Positionen mit je einem Methylester funktionalisiert. Diese Gruppen machen das Molekül einerseits sterisch anspruchsvoller und ermöglichen zum anderen zusätzliche Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche. Thioester **54** trägt einen Phenylsubstituenten, welcher sterisch anspruchsvoll, sehr starr und außerdem durch weitere π - π -Wechselwirkungen das Azobenzol in Richtung des Tyrosin-Tores und somit in die Nähe der Bindungstasche lenken könnte. Thioester **55** ist mit einem quartären Amin in *para*-Stellung funktionalisiert, welches die Wasserlöslichkeit des Azobenzolderivats erhöht. Des Weiteren könnte der positive Rest der Verbindung mit den hydrophilen Aminosäuren und der negativen Ladung des Carboxylatrestes des ASP54 im Inneren der Bindungstasche

wechselwirken und somit das Azobenzolderivat in seiner *cis*-Konfiguration über bzw. den Substituenten in der Bindungstasche fixieren.

Generell stehen für die Synthese unsymmetrischer Azobenzolderivate mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Besonders häufig werden die klassische Azokupplungsreaktion und die Mills-Reaktion verwendet.^[105-106] Die klassische Azokupplung verläuft über ein reaktives Diazoniumionsalz, das mit einer elektronenreichen Arylverbindung zu einer Azoverbindung reagieren kann. Bei der Mills-Reaktion dagegen wird eine aromatische Nitroverbindung mit Anilin oder einem entsprechenden Derivat umgesetzt. Die Nitrosfunktion kann hierbei einerseits oxidativ aus einem Amin oder reaktiv aus einer Nitroverbindung dargestellt werden. Für die Synthese der folgenden Azobenzolthioester **52-54** wurde jeweils die Mills-Reaktion verwendet.

Als Ausgangssubstanz für die Synthesesequenz des Thioesters **52** (Abb. 59) wurde 4-Nitrophenyl-essigsäure-*tert*-butylester (**41**) verwendet (Kapitel 3.2.2). Die Nitrofunktion wurde im ersten Schritt mit Wasserstoff unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle als Katalysator zum entsprechenden Amin **59** reduziert. Dieses wurde daraufhin mit Nitrosobenzol (**60**) in einer Mills-Reaktion in Eisessig zum Azobenzolderivat **61** umgesetzt.

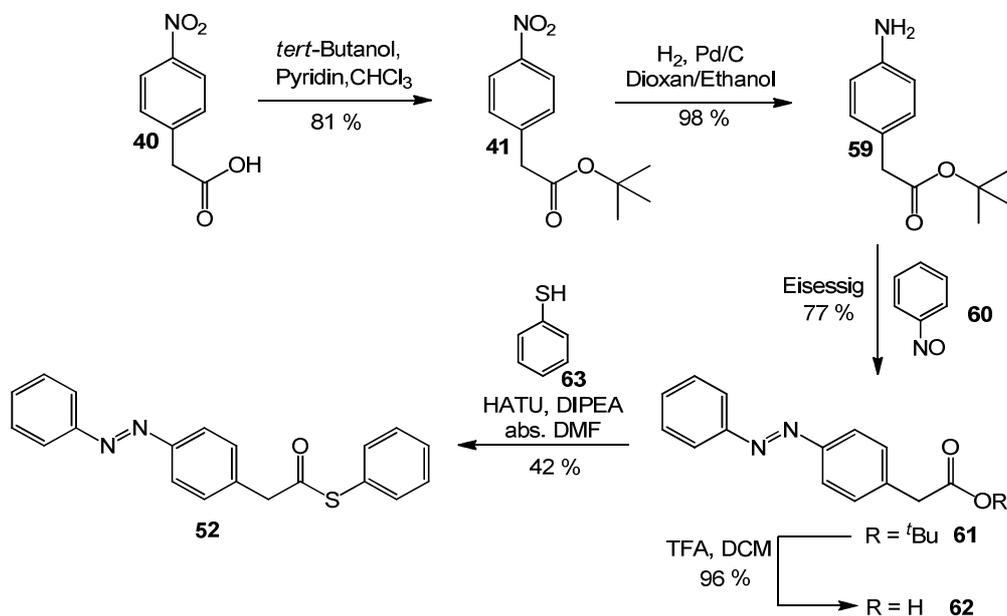


Abb. 59: Synthese des Azobenzolthioesters **52**. Nach der Azokondensation nach Mills erfolgte die HATU-vermittelte Kupplung zum Thioester.

Bei der Reaktion greift das nukleophile Amin das positiviert Stickstoffatom der Nitrosokomponente an, so dass nach Wasserabspaltung aus dem Intermediat die

Azoverbindung entsteht. Der *tert*-Butylester wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan entschützt und die freie Säure **62**^[107] anschließend in einer HATU-vermittelten Kupplungsreaktion mit Thiophenol (**63**) zum Thioester **52** umgesetzt.

Für die Synthese des Azobenzolthioesters **53** musste zunächst die Nitrosokomponente **42** aus der Nitroverbindung **41** generiert werden. Dieses erfolgte mit Zink und Ammoniumchlorid sowie anschließender Reaktion mit Eisenchlorid. In diesem zweistufigen Mechanismus wird die Nitrofunktion zunächst mit Zink zum Hydroxylamin umgesetzt, welches unter diesen Bedingungen aber nicht stabil ist und daher unmittelbar darauf mit Eisenchlorid zur Nitrosoverbindung reagiert.^[97] Im nächsten Schritt wurde die Azokondensation dieser Verbindung mit 4-Aminophtalat **64** in Eisessig durchgeführt. Die Säurefunktion des erhaltenen Azobenzolderivats **65** wurde anschließend mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan entschützt und über das mit Oxalylchlorid gebildete Säurechlorid mit Thiophenol verestert (Abb. 60).

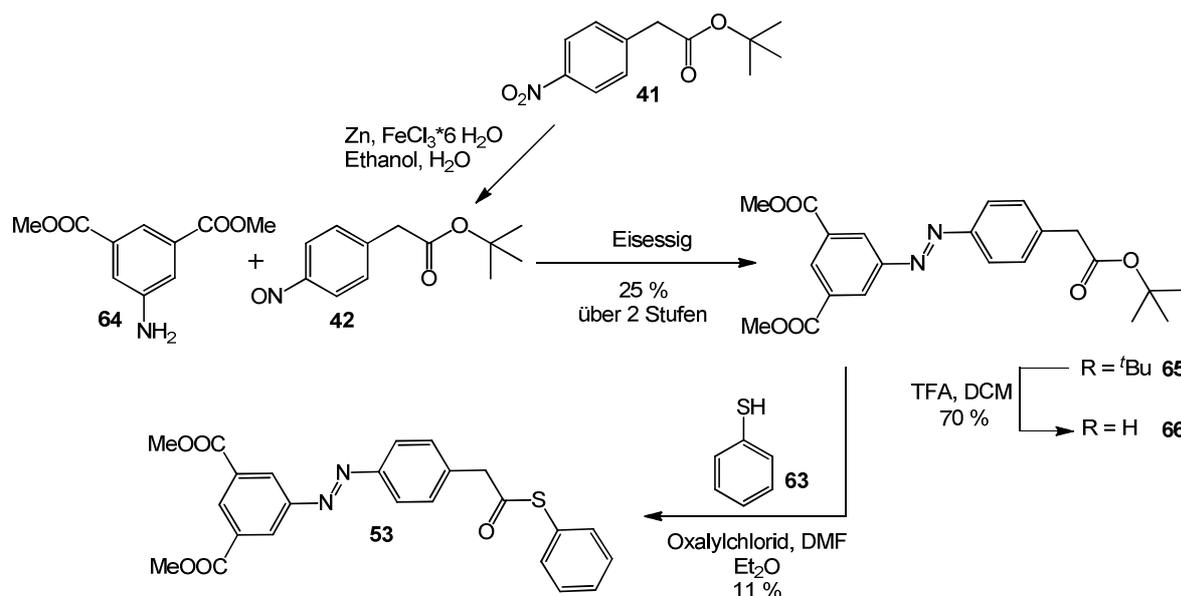


Abb. 60: Syntheseroute zum zweifach Methylester-substituierten Azobenzolthioester **53**.

Für die Funktionalisierung des Thioesters **54** wurde eine Suzuki-Miyaura-Kupplung ausgewählt (Abb. 61).^[108] Bei dieser C-C-Verknüpfungsreaktion können Organoborverbindungen mit Aryl- oder Alkenylhalogeniden umgesetzt werden, wobei Iodide den reaktivsten elektrophilen Partner darstellen.^[109] Die Kupplung kann in dieser Katalysereaktion im Gegensatz zur Stille-Reaktion nur unter basischen Bedingungen stattfinden. Die Base ist vermutlich in mehrere Stellen des Katalysezyklus und besonders im Transmetallierungsschritt involviert. Vor der Kupplungsreaktion musste zunächst das Azobenzolderivat als Boronsäure dargestellt werden. Statt einer freien Boronsäure wurde

allerdings ein Boronsäurepinakolester ausgewählt, der aufgrund seiner höheren Hydrolysestabilität besser zu handhaben ist und dadurch auch durch Säulenchromatographie aufgereinigt werden kann. Mit der Reaktion von 4-Nitrosophenylelessigsäure-*tert*-butylester (**42**) und dem Boronsäureester-funktionalisierten Amin **67** konnte das Azobenzolderivat **68** synthetisiert werden. Die erhaltene Zwischenstufe ist sehr interessant, da sie eine vielfältige Funktionalisierung der Azobenzoleinheit mit iodierten Kupplungspartnern ermöglicht. Die Säurefunktion wurde dazu zunächst mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan entschützt. Danach wurde mit Iodbenzol (**70**) und Kaliumcarbonat eine C-C-Verknüpfung zu dem Biphenylazobenzol **71** erreicht. Im letzten Schritt wurde die freie Säure mit Thiophenol (**63**) unter Peptidkupplungsbedingungen im basischen Milieu mit HATU verestert.

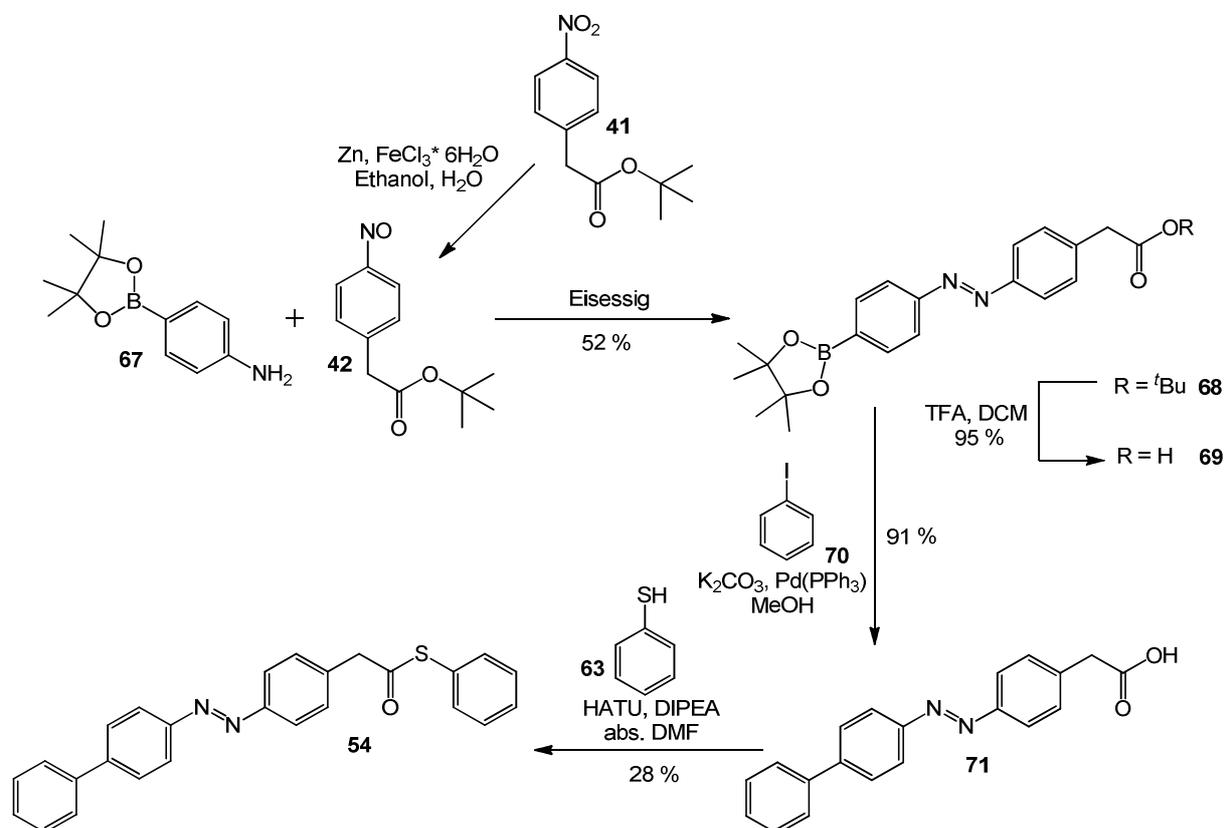


Abb. 61: Syntheseroute zum biphenylischen Thioester **54**, dessen C-C-Verknüpfung mittels Suzuki-Miyaura-Kupplung über den Boronsäurepinakolester **69** erreicht wurde.

Als Ausgangssubstanz für die Synthese des Thioesters **55** wurde das orthogonal geschützte Azobenzolderivat **43** verwendet, dessen Synthese in Kapitel 3.2.2 ausführlich beschrieben ist. Für die erste Funktionalisierung am Amin wurde zunächst die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin in *N,N*-Dimethylformamid abgespalten. Die Kupplung zum quartären Amin **74** wurde mit Betain **72**, welches zuvor mit Oxalylchlorid zum Säurechlorid **73** umgesetzt wurde, erreicht

(Abb. 62). Die Entschützung der Säurefunktion wurde mit Trifluoressigsäure in Wasser durchgeführt. In der anschließenden Kupplungsreaktion mit Thiophenol (**63**) ist das Produkt nur zu einem sehr geringen Anteil entstanden, welches im MALDI-MS-Experiment detektiert wurde. Eine Isolation des Konjugates war unter diesen Reaktionsbedingungen nicht möglich. Auch weitere Versuche der Kupplung von **75** mit Thiophenol über ein Säurechlorid oder mit anderen Kupplungsreagenzien schlugen fehl. Eventuell ist die hohe Polarität des ionischen Azobenzolderivats der Grund für den schlechten Umsatz. Weitere Versuche der Optimierung wurden bisher nicht unternommen.

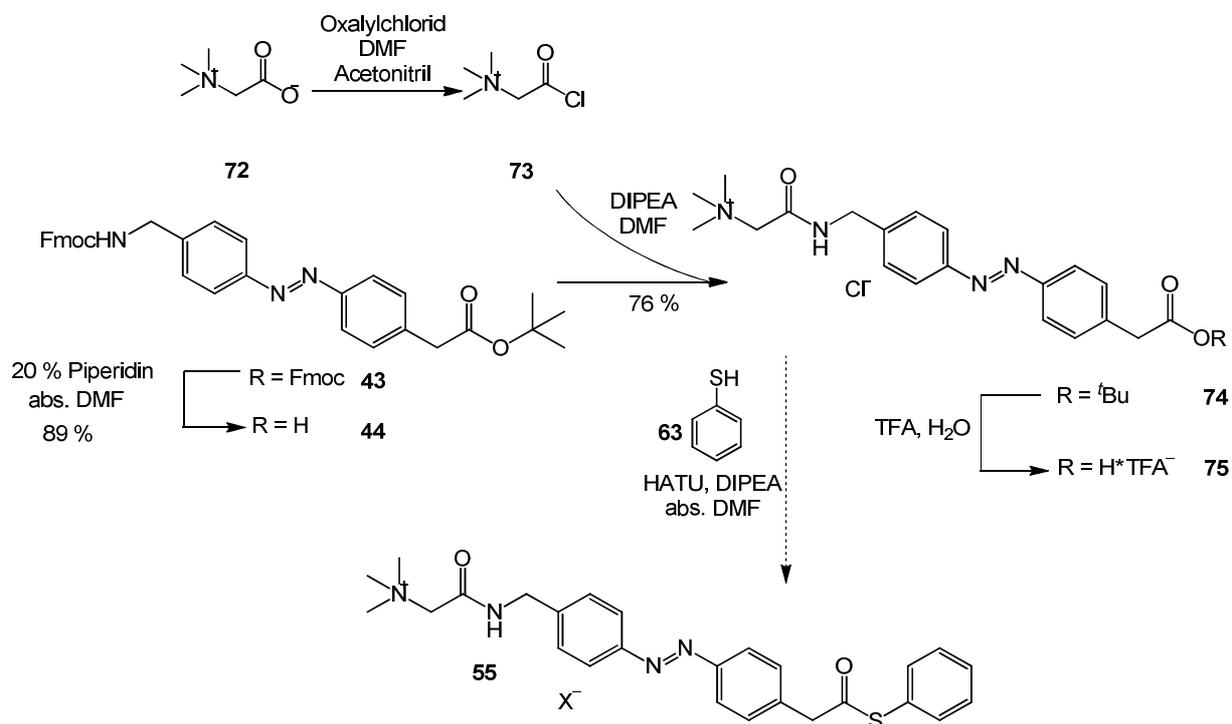


Abb. 62: Versuch der Synthese des Azobenzolthioesters **55** ausgehend von dem orthogonal geschützten Azobenzol **43**. (Gegenion X⁻ von **55** ist abhängig von der Aufreinigung der Verbindung. Beim Zusatz von Ameisensäure zur säulenchromatographischen Aufreinigung von **55** ist das Gegenion X⁻ das entsprechende Carboxylatanion.)

3.3.4 Theoretische Betrachtung der FimH-Modifizierung

Zur Visualisierung der kovalenten Bindungsbildung zwischen den Azobenzolderivaten **52-54** und FimH und um den Erfolg der Photoisomerisierung zur Schaltung der bakteriellen Adhäsion einzuschätzen, wurde die Funktionalisierung von FimH zunächst theoretisch durchgeführt. Dabei muss der Bindungsmechanismus in Lösung so gut wie möglich nachvollzogen werden (Abb. 63). Nachdem der DMAP-funktionalisierte Kohlenhydratligand mit dem Protein inkubiert wurde und dadurch in der Bindungstasche komplexiert vorliegt, wird der Azobenzolthioester hinzugegeben, der mit dem DMAP-Rest reagiert. Ausgehend vom Stickstoffatom im Pyridinring des Mannosidliganden erfolgt ein nukleophiler Angriff auf die Thioesterfunktion des Azobenzolderivats, woraufhin ein Aktivester als Intermediat gebildet wird. Diese Zwischenstufe befindet sich idealerweise weiterhin in der Bindungstasche und wird in diesem Zustand durch ein Nukleophil der Proteinoberfläche gespalten. Das Azobenzolderivat ist schließlich kovalent an eine Aminosäureseitenkette der Proteinoberfläche gebunden.

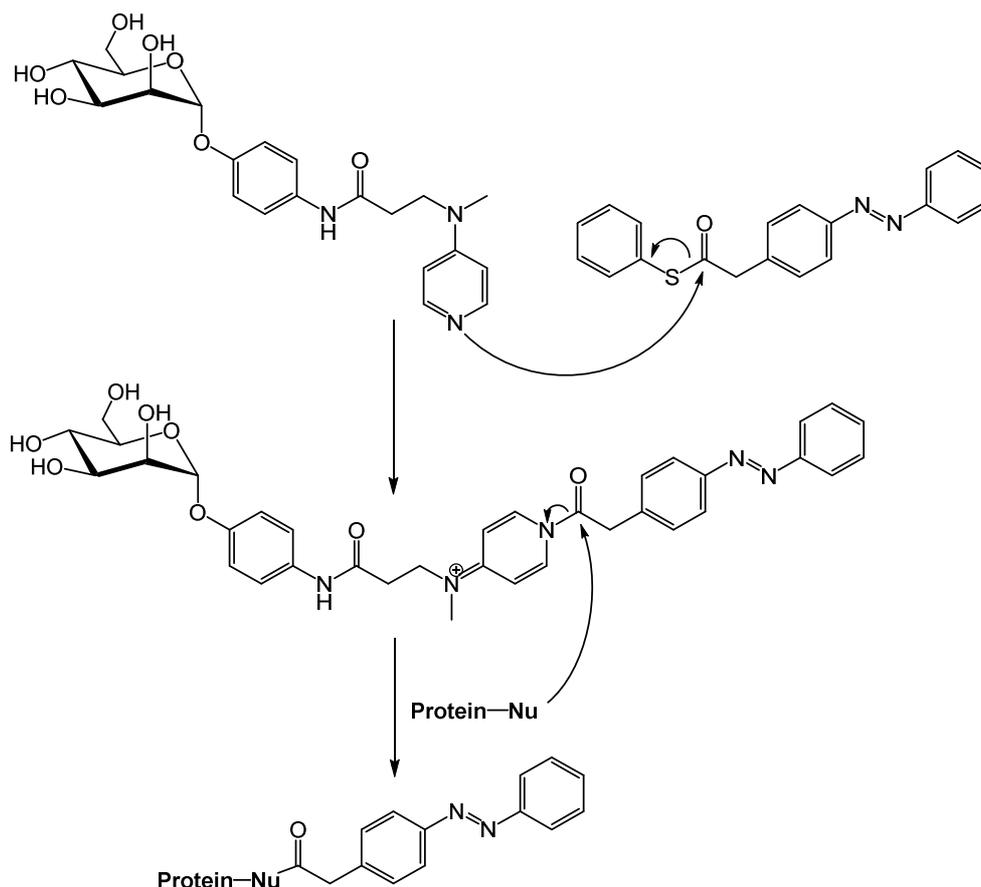
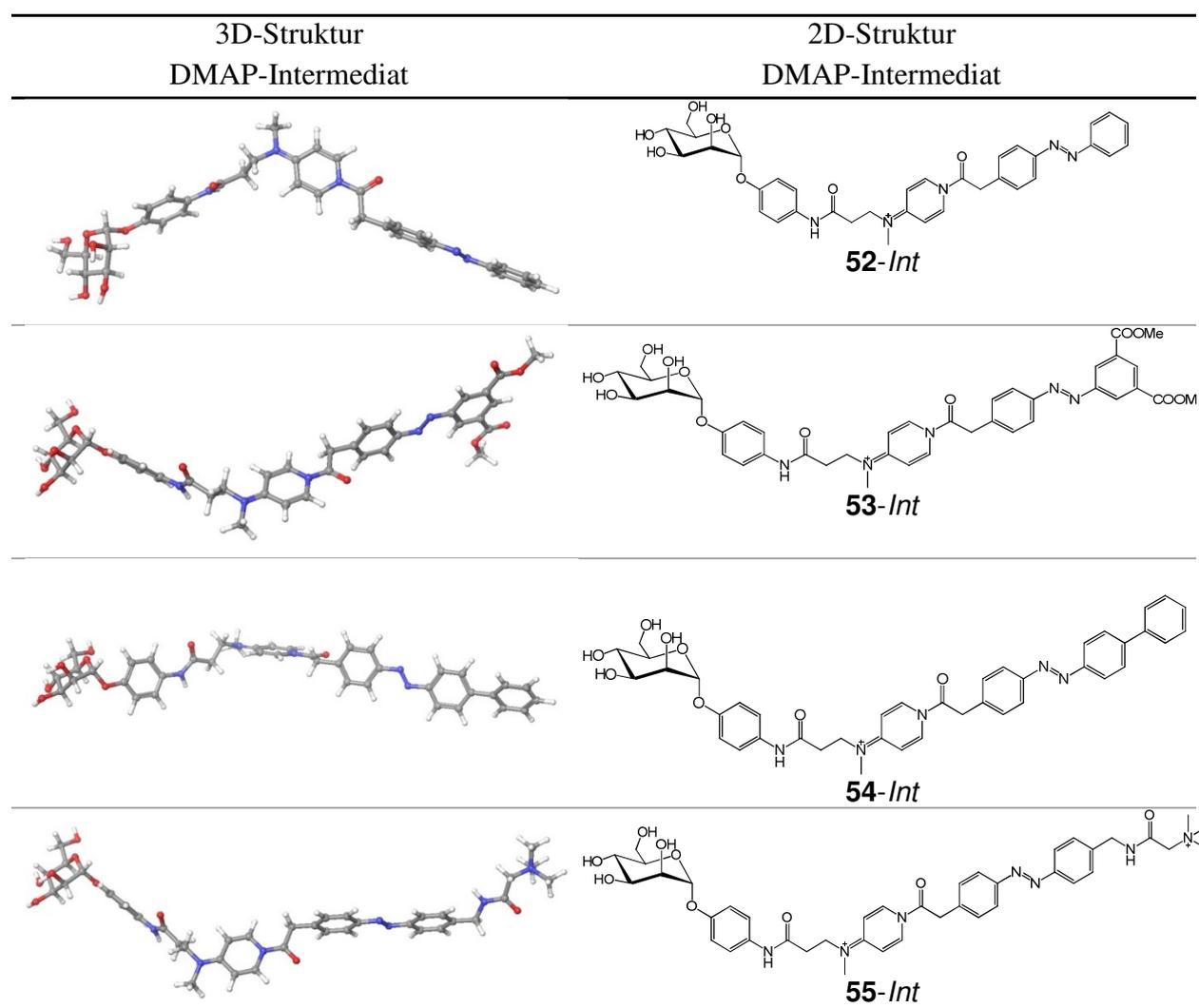


Abb. 63: Mechanismus der DMAP-katalysierten Ligationsreaktion am Beispiel von Ligand **51** und Azobenzolthioester **52**.

Um nun diese Reaktion theoretisch nachzustellen wurden die vier Azobenzolderivate **52-55** zunächst als Aktivester-Intermediat, welches nach der Reaktion des jeweiligen Thioesters mit DMAP-Ligand **51** entsteht, in die FimH-Bindungstasche gedockt. Diese Zwischenstufen der Azobenzolderivate **52-55** werden im Folgenden mit dem Zusatz „*Int*“ (für Intermediat) gekennzeichnet (Tab. 8). In der *closed gate*-Kristallstruktur binden alle Intermediate fest in die Bindungstasche, wohingegen sich die Mannoseeinheiten der Liganden **53-Int** und **54-Int** in der *open gate*-Kristallstruktur außerhalb der Tasche befinden und lediglich unspezifische Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche von FimH eingehen (für Scoring-Werte siehe Tab. 9).

Tab. 8: 2D- und 3D-Strukturen der reaktiven Zwischenstufen „*Int*“, welche aus der Reaktion von DMAP-Ligand **51** und den Azobenzolthioestern **52-55** entstehen.



In diesem Zusammenhang muss beachtet werden, dass die Acyltransferreaktion mit dem Nukleophil eventuell schneller verläuft, als sich das thermodynamische Gleichgewicht zwischen Ligandintermediat und Protein einstellt. Daher ist die unspezifische Bindung in

diesem Fall kein Ausschlusskriterium für eine erfolgreiche Modifizierungsreaktion an der FimH-Bindungstasche.

Verbindung	Scoring-Wert <i>closed gate</i> -Struktur	Scoring-Wert <i>open gate</i> -Struktur
52-Int	-9.39	-7.77
53-Int	-8.94	-6.79
54-Int	-8.52	unspez. Bindung
55-Int	-8.86	unspez. Bindung

Tab. 9: Docking-Ergebnisse der reaktiven Zwischenstufen **52-55-Int**. Beide Kristallstrukturen (*open gate* und *closed gate*) wurden betrachtet. Die erhaltenen Docking-Scores korrelieren mit der Bindungsaffinität. Je negativer der Wert, desto höher ist die Affinität der Liganden zur FimH-Bindungstasche. Bis auf Ligand **54-Int** und **55-Int** in der *open gate*-Struktur binden alle Intermediate in die Bindungstasche.

Als nächstes wurde die räumliche Umgebung der aktivierten Carbonylfunktion nach potentiellen Nucleophilen abgesucht, um anschließend Bindungsbruch und Bindungsbildung zur Proteinoberfläche manuell zu vollziehen. Als potentielle Nucleophile für die kovalente Bindungsbildung wurden zunächst vor allem die Hydroxylgruppen der Tyrosinreste TYR48 und TYR137 sowie des THR51 identifiziert (Abb.64). Von der räumlichen Nähe zur Bindungstasche kommt weiterhin die Guanidinfunktionalität von ARG98 in Frage. Primäre Amine können jedoch je nach pKa-Wert auch protoniert vorliegen, welcher bei Arginin bei 12.5 liegt (Abb. 65). Unter den eingestellten Reaktionsbedingungen von pH 8 wird das Amin daher größtenteils protoniert vorliegen, wodurch die Reaktivität als Nucleophil sehr gering ausfallen dürfte. Des Weiteren könnte die Reaktivität auch durch die Mesomerie der Iminbindung herabgesetzt sein. Als reaktives Nucleophil wurde Arginin daher ausgeschlossen.

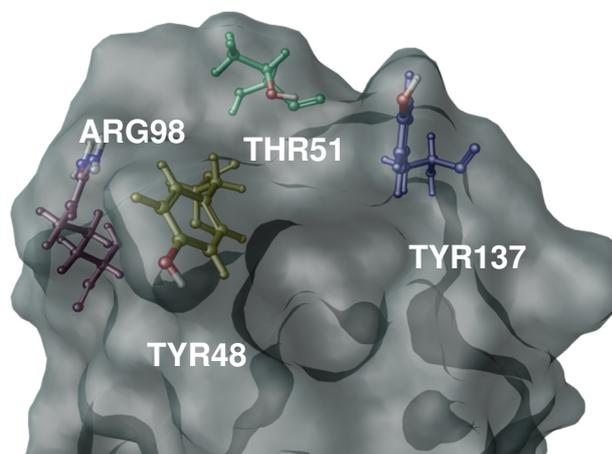


Abb.: 64: Nucleophile Funktionen in Nähe der FimH-Bindungstasche wurden in den Seitenketten der Aminosäuren TYR48, TYR137, THR51 und ARG98 identifiziert.

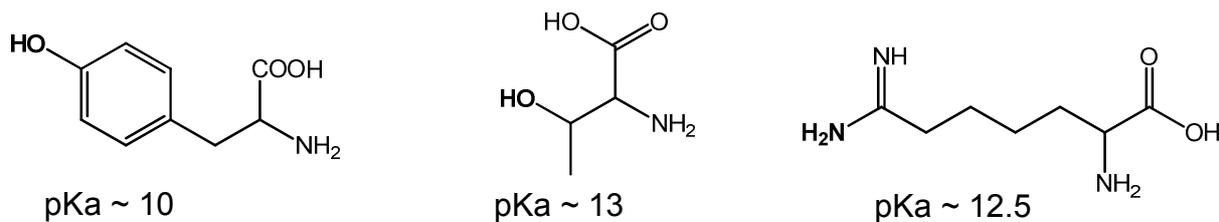


Abb. 65: pKa-Werte der Aminosäureseitenketten von Tyrosin, Threonin und Arginin, welche sich an der FimH-Bindungstasche befinden.

Die kovalente Bindungsbildung der Azobenzolderivate zu einem der identifizierten Nukleophile wurde manuell aus der gedockten Vorlage der jeweiligen Intermediate **52-55-Int** vollzogen. Danach wurde das modifizierte Protein energieminiert. Für die Bestimmung der thermodynamisch günstigsten Ausrichtung an FimH wurde die Azobenzoleinheit um zwei verschiedene Diederwinkel um die Bindungstasche rotiert, wobei die potentielle Energie in den verschiedenen Positionen berechnet wurde (Abb. 66).

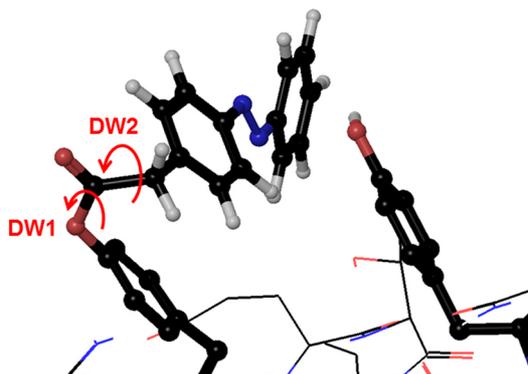


Abb. 66: Für die Einschätzung der energetisch günstigsten Position der Azobenzolderivate am FimH wurden die kovalent gebundenen Azobenzoleinheiten um zwei verschiedene Diederwinkel rotiert.

Beide Diederwinkel wurden gleichzeitig in 30°-Schritten um 360° gedreht, was bedeutet, dass Diederwinkel 2 (DW2) in 30° Schritten verstellt wurde und bei jedem einzelnen dieser Schritte der Diederwinkel 1 (DW1) ebenfalls in 30°-Schritten um 360° gedreht wird. Dabei wurden pro Rechnung 170 verschiedene Konformationen erhalten, von denen jeweils die potentielle Energie berechnet wurde. Der gesamte Prozess ausgehend vom Docking des Intermediats, der manuellen Bindungsbildung, Minimierung der Proteinstruktur und Darstellung der Minimumstrukturen der *trans*- und *cis*-Form ist in Abb. 67 für das Azobenzolderivat **52** exemplarisch dargestellt (für die Darstellung der Azobenzolderivate **53-55** vgl. Anhang 6.2.4).

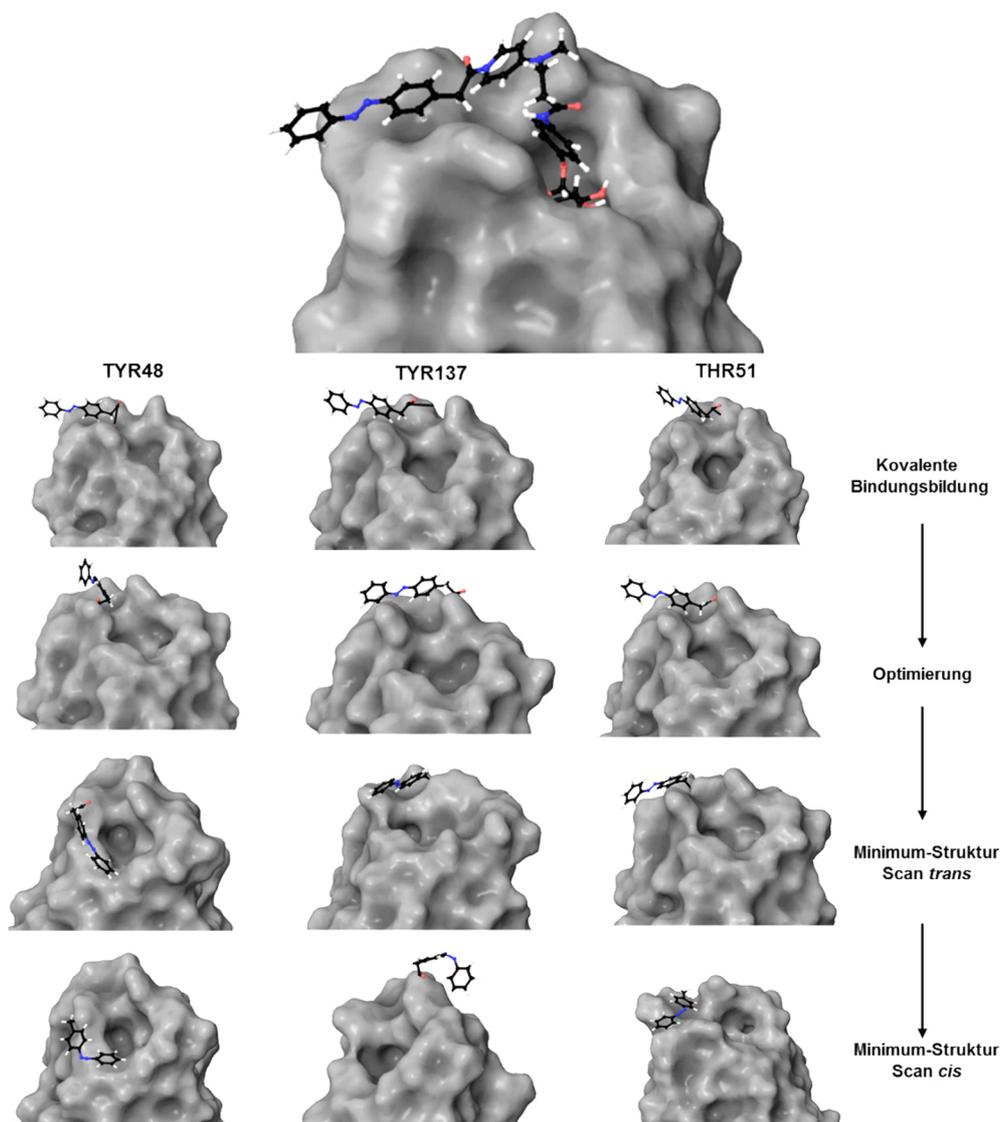


Abb. 67: Ablauf der theoretisch durchgeführten FimH-Modifizierung anhand von Azobenzolderivat **52**: Nach dem Docking des Intermediats **52-Int** erfolgt manuell die kovalente Bindungsbildung. Diese Struktur wird im nächsten Schritt energieminimiert; anschließend werden Diederwinkel-Scans in der *trans*- und der *cis*-Konfiguration des Azobenzolderivats durchgeführt. Die gezeigte Minimumstruktur stellt die energetisch günstigste Konformation aus 170 Konformationen dar.

Die Rechnungen wurden für alle vier Azobenzolderivate **52-55** jeweils für die Bindung an die Nukleophile TYR48, TYR137 und THR51 in der *closed* und *open gate*-Kristallstruktur von FimH durchgeführt. Die Nukleophile, welche aus der räumlichen Umgebung zu den jeweiligen intermediären Strukturen bevorzugt zu betrachten sind, sind in der Tab. 10 aufgeführt sowie aus den Ligand-Interaktionsdiagrammen (siehe Abb. 68 und Anhang 6.2.3) zu entnehmen.

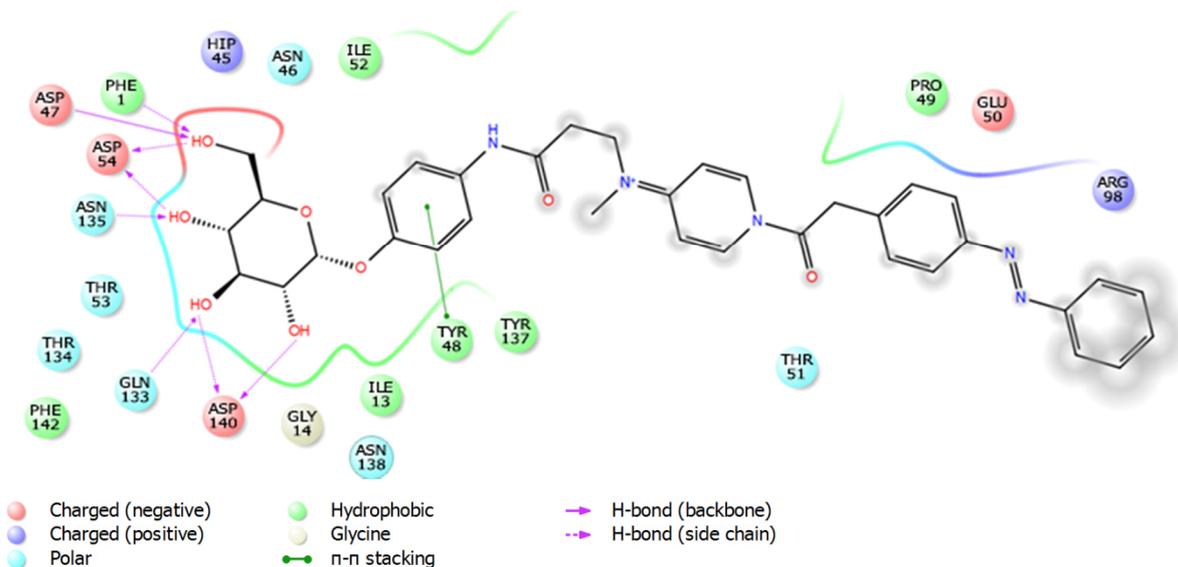


Abb. 68: Dargestellt ist ein Ligand-Interaktionsdiagramm des in die Bindungstasche gedockten Reaktionsintermediats **52-Int** (PDB-Code:1KLF). In diesem Fall befindet sich vor allem das THR51 in Nähe der zu spaltenden Aktivesterfunktion.

Tab. 10: Aus dem Ligand-Interaktionsdiagramm der gedockten Strukturen **52-55-Int** wurden die Nucleophile ermittelt, welche für die kovalente Bindungsbildung bevorzugt zu betrachten sind, da sie der aktivierten Carbonylfunktion am nächsten stehen (Abb. 65 und Kapitel 6.2.3).

Azobenzol-Intermediat	Potentiell Nucleophil	Potentiell Nucleophil
	<i>open gate</i> -Struktur	<i>closed gate</i> -Struktur
52-Int	THR51	TYR48
53-Int	THR51	TYR48/THR51
54-Int	THR51/TYR137	TYR48/TYR137
55-Int	TYR48	TYR48

Die Auswertung der 170 Strukturen jeder Rechnung wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst wurden aus jeder Rotation um den Diederwinkel 1 (DW1) die Konformation mit der niedrigsten Energie ausgewählt. Jede dieser Konformation steht für eine einzelne Winkeländerung um 30° des Diederwinkels 2 (DW2). Diese 13 Minimumstrukturen wurden wiederum gegen den eingestellten Winkel DW2 aufgetragen. Aus der graphischen Auftragung der Minimumstrukturen können nun die günstigsten Strukturen für den gesamten Scan herausgelesen werden (alle Graphen und Bilder der günstigsten Strukturen befinden sich im Anhang 6.2.4). Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab. 11 dargestellt. Keiner der Liganden zeigt ein positives Ergebnis für alle Nucleophile, aber jedes Azobenzolderivat hat für mindestens ein Nucleophil eine positive *cis/trans*-Kombination, in der einige

Minimumstrukturen die Bindungstasche in der *trans*-Konfiguration offen halten und in der *cis*-Konfiguration sterisch blockieren. Auf die positiven Kombinationen und das Potential der einzelnen Azobenzolstrukturen wird im Folgenden näher eingegangen.

Tab. 11: Übersichtstabelle der Ergebnisse der Diederwinkel-Scans. Für die Bindung an die Nukleophile TYR48, TYR137 und THR51 wurde beschrieben, ob Minimumstrukturen der Scans die Bindungstasche in *trans*-Konfiguration offen bzw. in *cis*-Konfiguration geschlossen halten. Positive *cis-trans*-Kombinationen sind in der Tabelle markiert.

Strukturen mit offener Bindungstasche			Strukturen mit geschlossener Bindungstasche		
<i>trans</i>	<i>open gate</i>	<i>closed gate</i>	<i>cis</i>	<i>open gate</i>	<i>closed gate</i>
52			52		
TYR48	ja	ja	TYR48	ja	nein
TYR137	nein	ja	TYR137	ja	nein
THR51	ja	ja	THR51	nein	nein
53			53		
TYR48	ja	ja	TYR48	ja	ja
TYR137	ja	ja	TYR137	nein	nein
THR51	ja	ja	THR51	nein	ja
54			54		
TYR48	ja	ja	TYR48	ja	nein
TYR137	ja	ja	TYR137	nein	ja
THR51	ja	ja	THR51	nein	nein
55			55		
TYR48	ja	ja	TYR48	ja	nein
TYR137	ja	ja	TYR137	nein	ja
THR51	ja	ja	THR51	nein	nein

Das Azobenzolderivat **52** hat nur eine positive Kombination (Abb. 69). Bei dieser ist die Azoverbindung in der *open gate*-Kristallstruktur an TYR48 gebunden. In *trans*-Konfiguration sind in diesem Fall alle Minimumstrukturen positiv, in *cis*-Konfiguration gibt es nur eine Struktur unter den 13 minimalen, welche die Bindungstasche verschließt (Abb. 69, Bild a). Insgesamt sind andere Konformationen, welche nicht in Richtung der Bindungstasche zeigen energetisch günstiger. Die sterische Ausdehnung des Azobenzolderivats scheint insgesamt nicht ausreichend zu sein, um die FimH-Bindungstasche zu verschließen. Eine

Funktionalisierung am endständigen Benzolring der Azobenzoleinheit scheint daher für eine effiziente Blockierung der FimH-Bindungstasche in *cis*-Konfiguration unabdingbar.

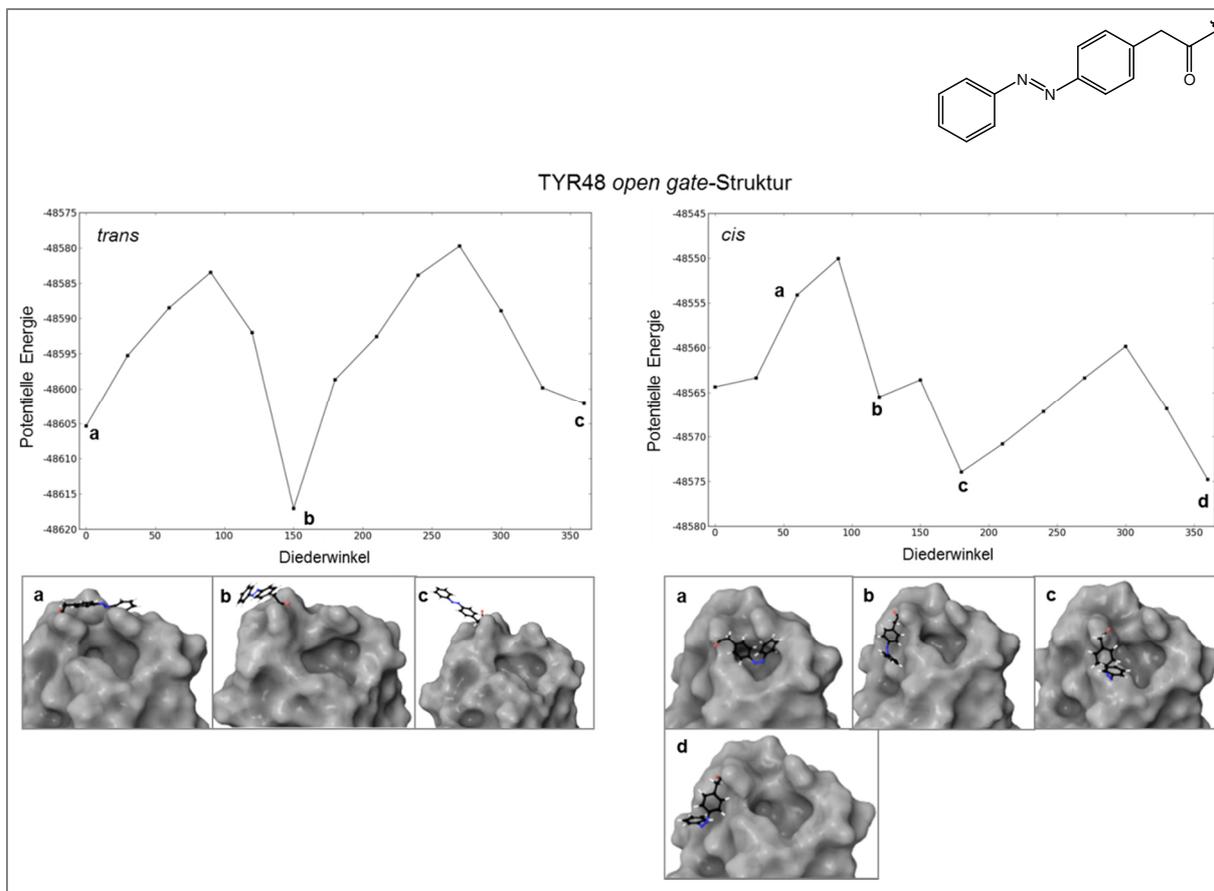


Abb. 69: Ergebnisse der Bindung des Azobenzolderivats **52** an den Aminosäurerest TYR48 in *trans*- und *cis*-Konfiguration (*open gate*-Kristallstruktur). Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie der Konformationen gegen den Diederwinkel ϕ .

Das Azobenzolderivat **53** ist in 3- und 5-Position am äußeren Benzolring durch zwei Methylester funktionalisiert, wodurch seine sterische Ausdehnung im Vergleich zu **52** erhöht ist. Insgesamt ergeben sich für diese Struktur drei positive Kombinationen. Eine für die *open gate*- und zwei für die *closed gate*-Kristallstruktur von FimH. Gebunden an das TYR48 in der *open gate*-Struktur verschließen alle in der Graphik ermittelten *cis*-konfigurierten Minimumstrukturen die Bindungstasche (Abb. 70). In *trans*-Konfiguration ist die Bindungstasche häufig geöffnet, aber in den energetisch günstigsten Strukturen liegt der äußerste Phenylring von **53** über dem Eingang (Abb. 70, Bild a, c). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für die *closed gate*-Struktur erhalten, und zwar im Fall der Ligation an TYR48 bzw. THR51 (Abb. 71, 72). Insgesamt ist das Azobenzolderivat **53** von seiner sterischen Ausdehnung und der bevorzugten Positionierung in Richtung der Bindungstasche sehr positiv zu bewerten. Ob eine Bindung von Liganden in der *trans*-Konfiguration aber möglich ist, bleibt fraglich.

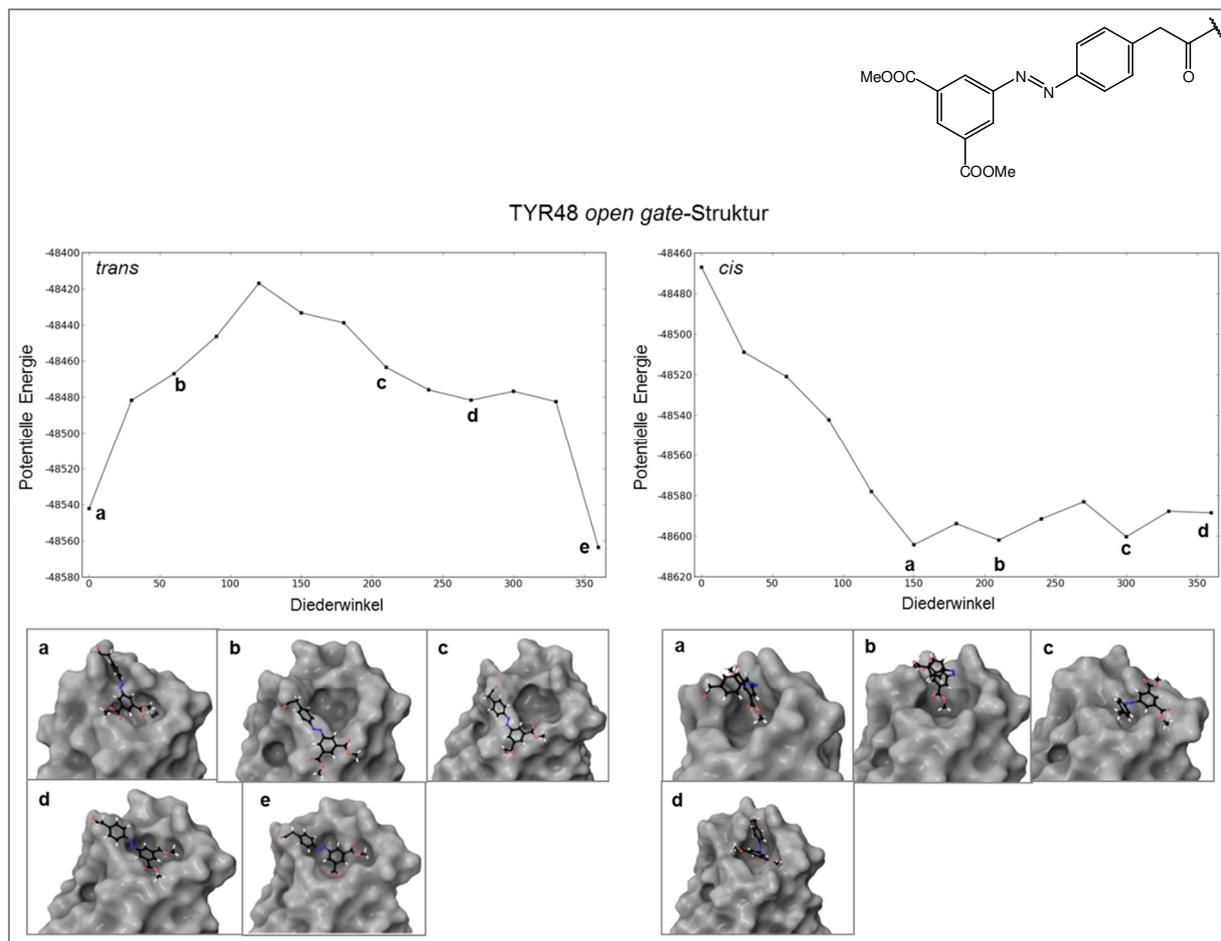


Abb. 70: Ergebnis der Diederwinkel-Scans des Azobenzolderivats **53** an TYR48 (*open gate*-Kristallstruktur). Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie der Konformationen gegen den Diederwinkel ϕ .

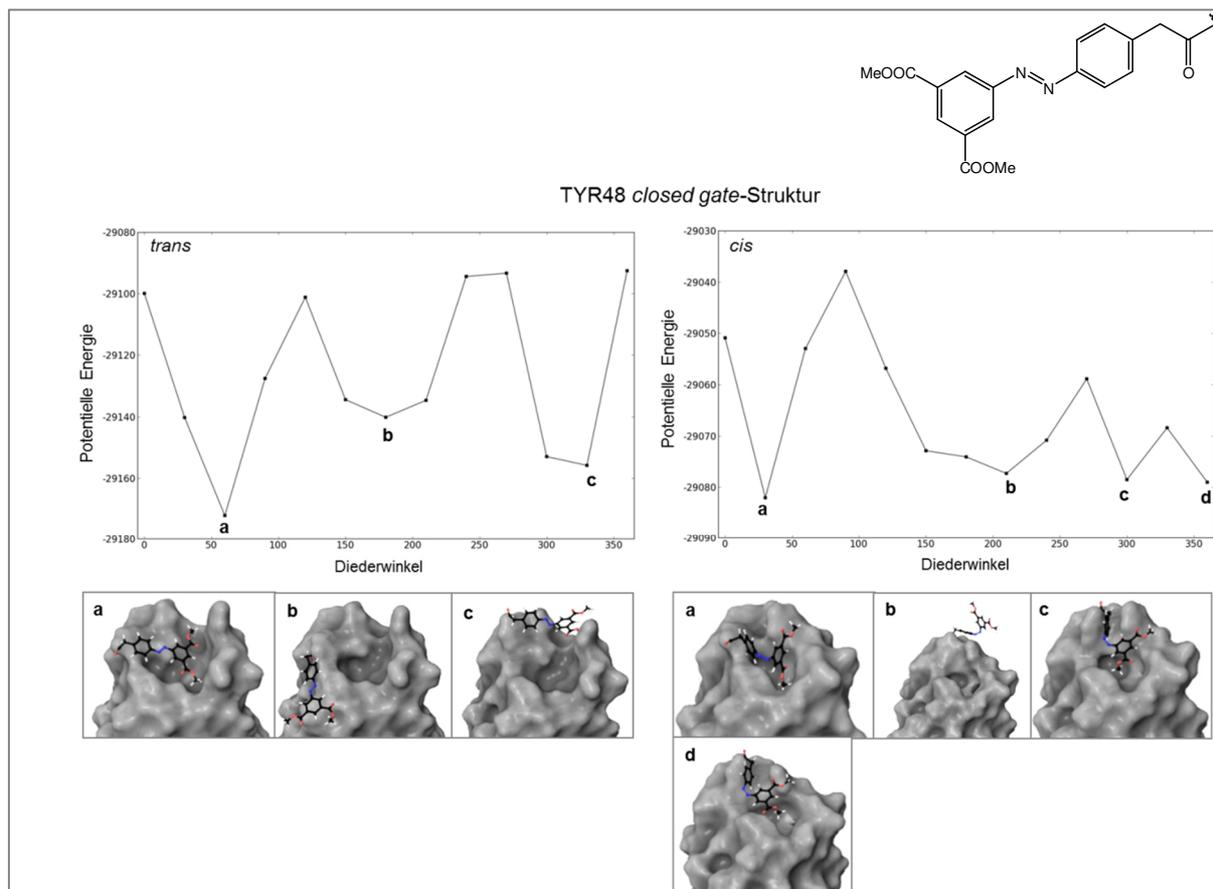


Abb. 71: Ergebnis der Diederwinkelscans des Azobenzolderivats **53** gebunden an TYR48 (*closed gate*-Kristallstruktur). Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie der Konformationen gegen den Diederwinkel 2.

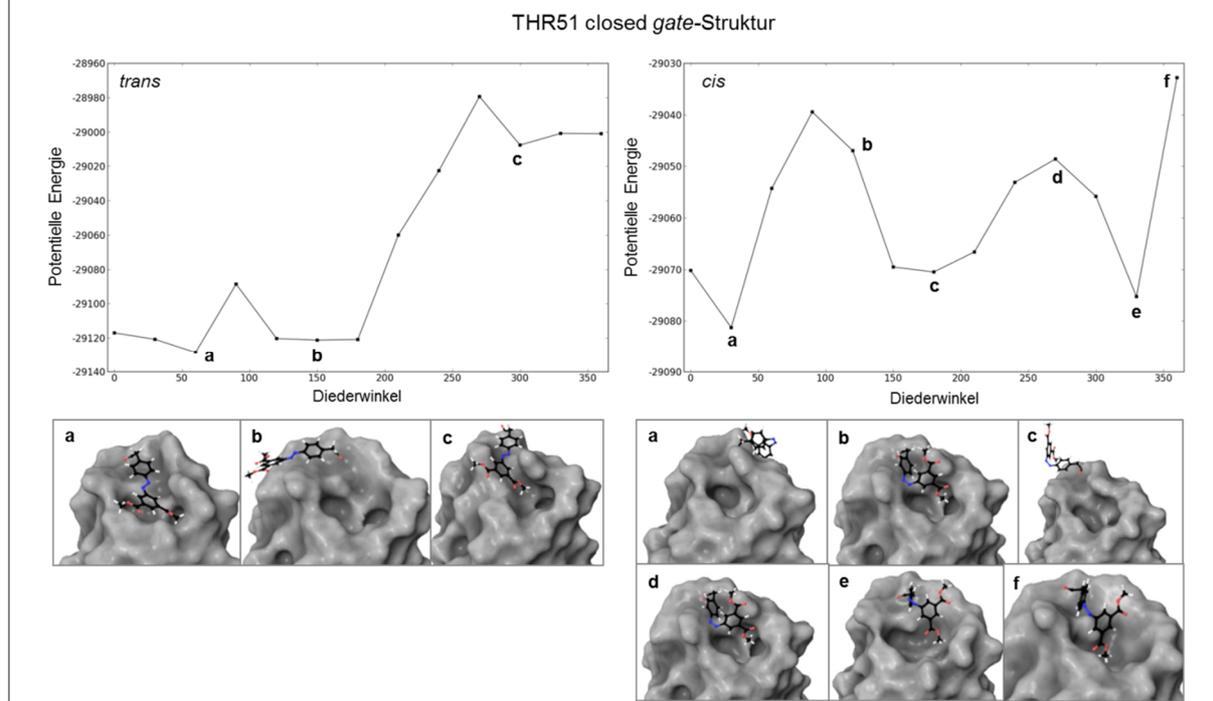


Abb. 72: Ergebnis der Diederwinkel-Scans des Azobenzolderivats **53** nach Ligation an THR51 (*closed gate*-Kristallstruktur). Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie der Konformationen gegen den Diederwinkel 2.

Das Azobenzolderivat **54** trägt einen zusätzlichen Phenylsubstituenten; die Verbindung ist dadurch sehr lang und starr. Nach der Durchführung der Rotation um die Bindungstasche ergibt sich jeweils eine positive *cis/trans*-Kombination für beide Kristallstrukturen (Abb. 73, 74). Bei der *open gate*-Struktur ist das Azobenzolderivat dabei an TYR48 gebunden. Hier gibt es in der *trans*-Konfiguration aber auch Strukturen, welche die Bindungstasche verschließen und energetisch sehr günstig sind. In *cis*-Konfiguration ist die Struktur c (Abb. 73) besonders hervorzuheben. Diese verschließt den Eingang zur CRD sehr effizient, wobei der zweite Phenylring in die Bindungstasche eintaucht. Für die *closed gate*-Struktur ist die positive Kombination durch die Bindung an TYR137 entstanden. Dabei fällt allerdings negativ auf, dass der aromatische Rest des TYR137 in einigen Strukturen über die Bindungstasche bewegt wird, so dass sich die Struktur des eigentlichen Proteins verändert (Abb. 74, Bild a). Positiv dagegen ist, dass die Energieminimumstruktur, welche die Bindungstasche in *cis*-Form verschließt energetisch am günstigsten ist.

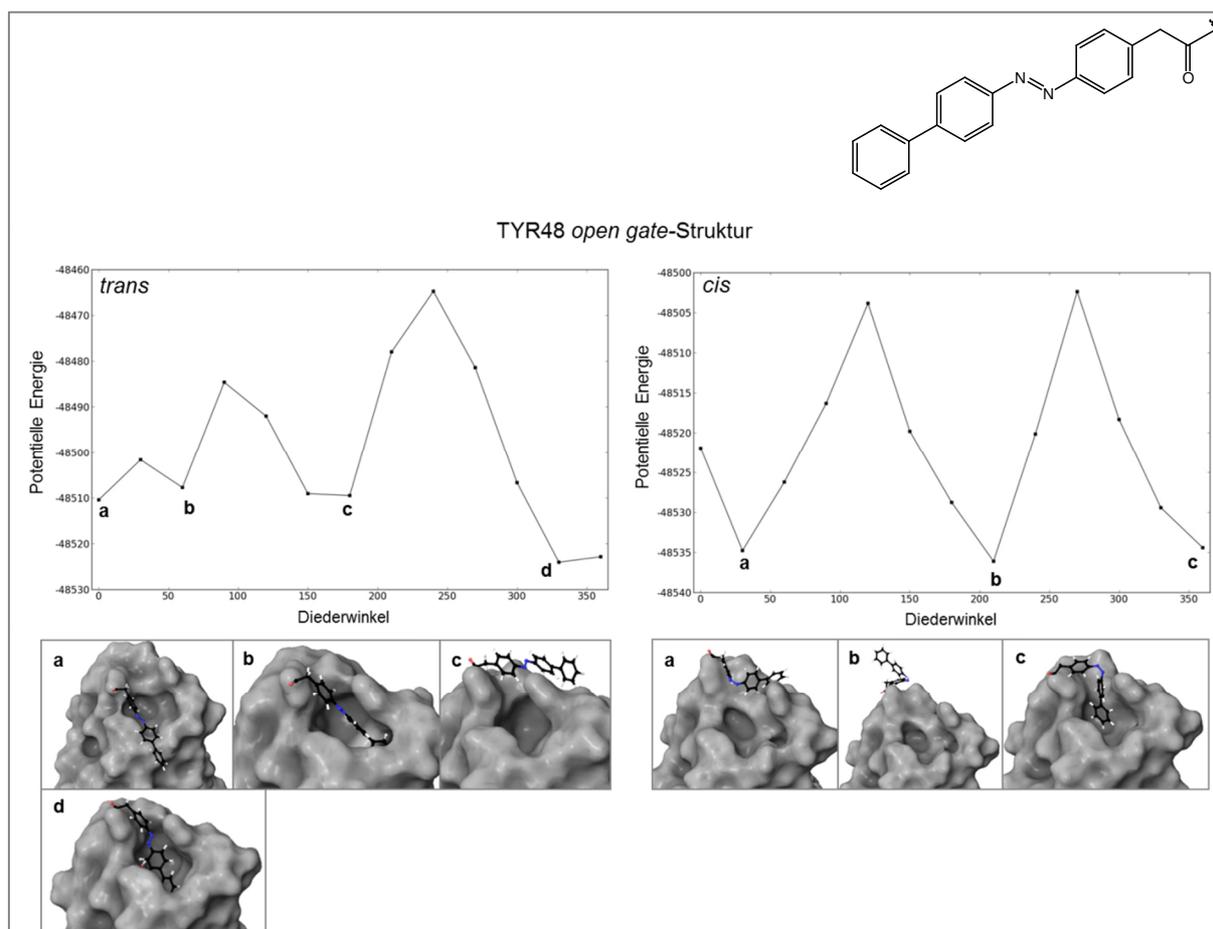


Abb. 73: Ergebnis der Diederwinkel-Scans des Azobenzolderivats **54** gebunden an TYR48 für die (*open gate*-Kristallstruktur). Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie der Konformationen gegen den Diederwinkel 2.

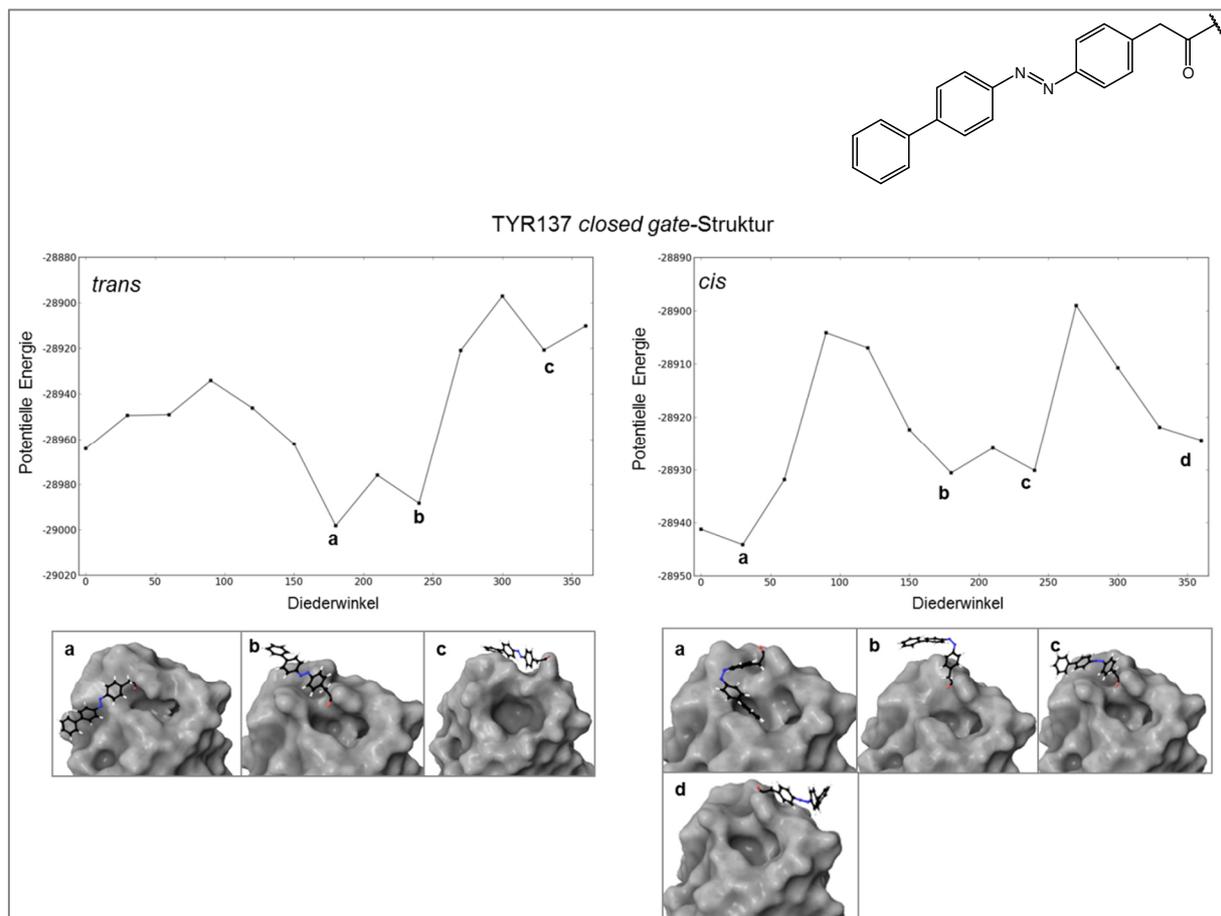


Abb. 74: Ergebnis der Diederwinkel-Scans des Azobenzolderivats **54** gebunden an TYR48 (*closed gate*-Kristallstruktur). Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie der Konformationen gegen den Diederwinkel 2.

Das Azobenzolderivat **55** hat wiederum zwei positive *cis/trans*-Kombinationen. In der *open gate*-Struktur gebunden an TYR48 ergibt sich für **55** in *trans*- und *cis*-Konfiguration jeweils für die energetisch günstigsten Strukturen das gewünschte Ergebnis. In der *cis*-Konfiguration taucht der Ammoniumsubstituent bevorzugt in die Bindungstasche ein, was auch durch ionische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Inneren der FimH-Bindungstasche bedingt sein könnte. Insgesamt sehen die Strukturen sehr vielversprechend aus. In der *closed gate*-Struktur ergibt sich für die Bindung an das TYR137 ein ähnliches Bild, wobei der Ammoniumsubstituent aber nicht so weit in die Bindungstasche bewegt wird.

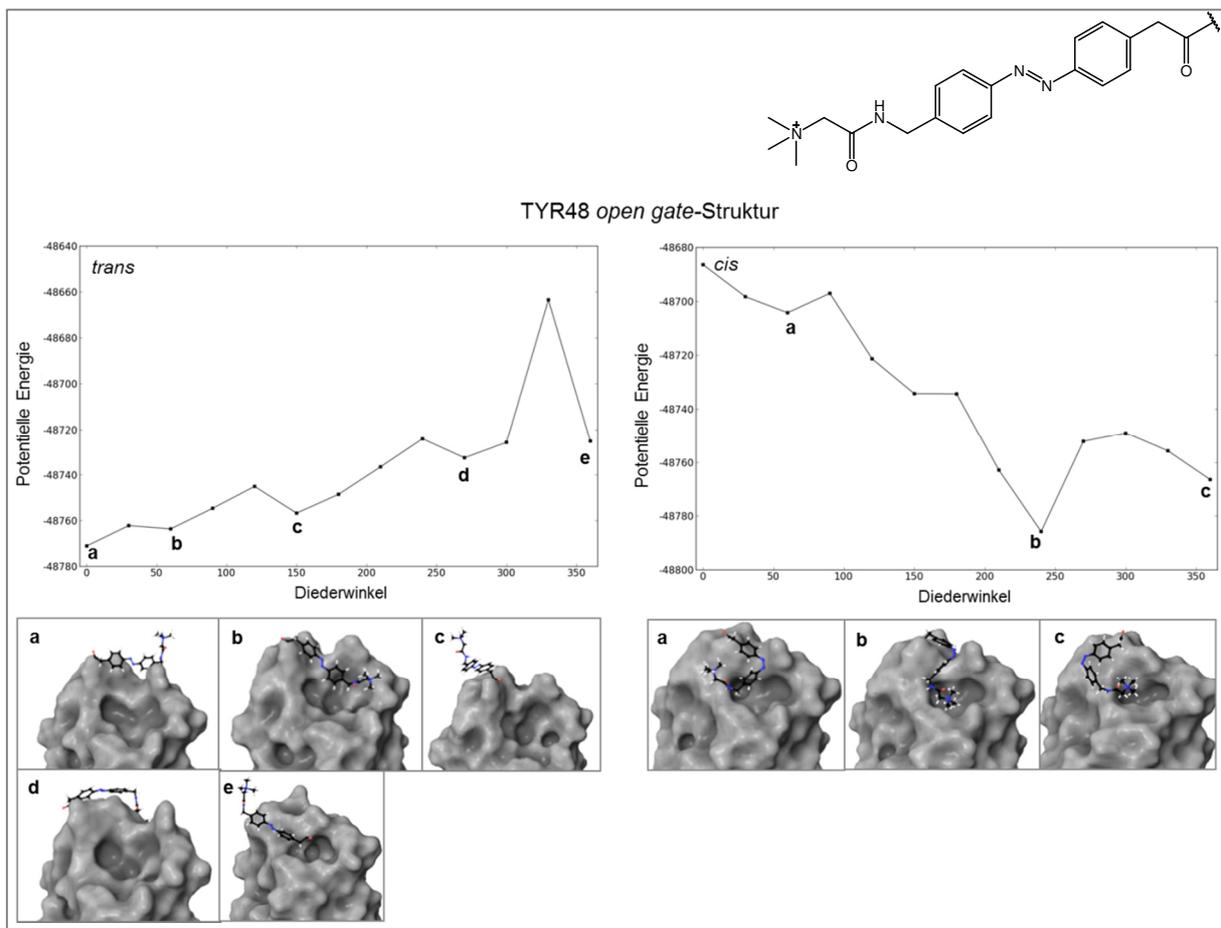


Abb. 75: Ergebnis der Diederwinkel-Scans des Azobenzolderivats **55** gebunden an TYR48 (*open gate*-Kristallstruktur). Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie der Konformationen gegen den Diederwinkel ϕ .

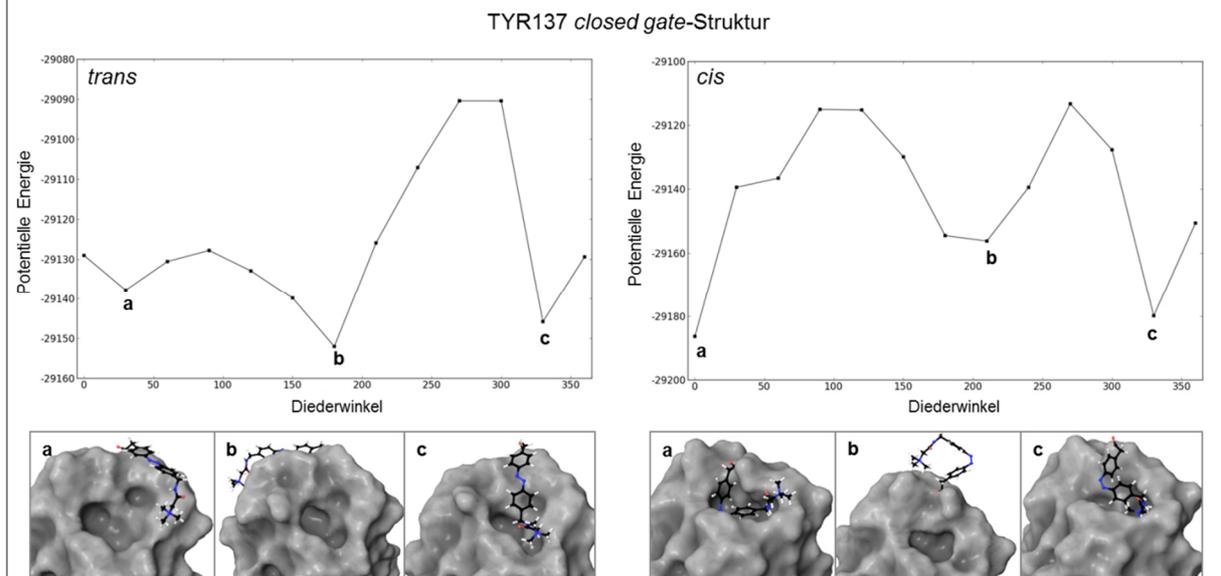


Abb. 76: Ergebnis der Diederwinkel-Scans des Azobenzolderivats **55** gebunden an TYR137 (*closed gate*-Kristallstruktur). Aufgetragen ist jeweils die potentielle Energie der Konformationen gegen den Diederwinkel ϕ .

Aus der theoretischen Betrachtung lässt sich zusammenfassend sagen, dass alle Azobenzolderivate generell das Potential haben, die FimH-Bindungstasche reversibel zu verschließen, aber eine Substitution am äußeren Phenylring der Azobenzoleinheit den Verschluss effizienter macht. Ist die Azobenzoleinheit in *para*-Stellung substituiert, kann der Substituent in die Bindungstasche eintauchen, was besonders bei dem kationischen Azobenzolderivat **55** positiv auffällt. Das Azobenzolderivat mit den meisten positiven Strukturen ist jedoch das Methylester-substituierte Derivat **53**, welches durch seine 3,5-Funktionalisierung die Bindungstasche breit abschirmen kann. Insgesamt ist die Lage der Azobenzoleinheiten aber noch zu wenig zielgerichtet. Gerade aus der graphischen Auftragung wird deutlich, dass in den meisten Fällen viele Energieminima vorhanden sind. Daraus lässt sich ableiten, dass die Azobenzoleinheit in dieser Form am Protein sehr flexibel ausgerichtet sein könnte. Ein Substituent, der besonders in der *cis*-Konfiguration eine bevorzugte Richtung durch spezifische Wechselwirkungen eines Affinitätssubstituenten vorgibt, könnte dabei einen entscheidenden Vorteil bringen, wie sich bereits aus bei der Betrachtung von **55** angedeutet hat. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Azobenzolthioester konzipiert, der in *para*-Stellung mit einer Mannoseeinheit funktionalisiert ist. Als natürlicher Ligand des FimH könnte dieses Azobenzolderivat die Bindungstasche in *cis*-Konfiguration effektiver und insgesamt zielgerichteter verschließen als die bisher betrachteten Strukturen **52-55**. Der Thioester **76** konnte bereits von STAMER innerhalb einer Masterarbeit^[110] dargestellt werden und wurde im Folgenden neben den Verbindungen **52**, **53** und **54** ebenfalls für Ligationsexperimente verwendet (Abb.77).

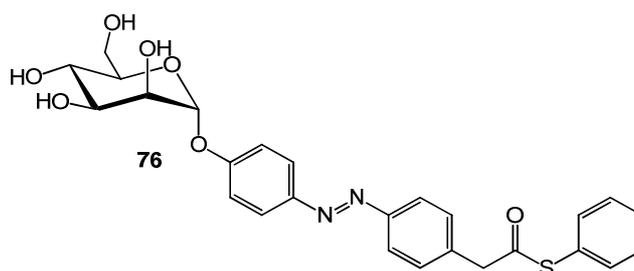


Abb. 77: Weiterentwickelter Thioester **76** mit mannosidischem Affinitätsanker.^[110]

3.3.5 Modifizierung von FimH

Nach ausführlicher theoretischer Betrachtung der Ligationsreaktion wurden erste Versuche der FimH-Modifizierung unternommen. Als Puffersystem wurde 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) ausgewählt, da dieses eine gute Pufferkapazität zwischen pH 6.8 und 8.2 hat und die Reaktionen bei einem pH-Wert von 8 analog zu HAMACHI durchgeführt wurden.^[51] Die Konzentration des Puffers wurde allerdings von den dort verwendeten 50 mM auf 10 mM herabgesetzt, um die Reaktionen mit weniger Salzkonzentration im MALDI-MS untersuchen zu können. Die ersten Versuche wurden mit beiden DMAP-Liganden **50** und **51** und den Azobenzolthioestern **52-54** durchgeführt (Abb. 78).

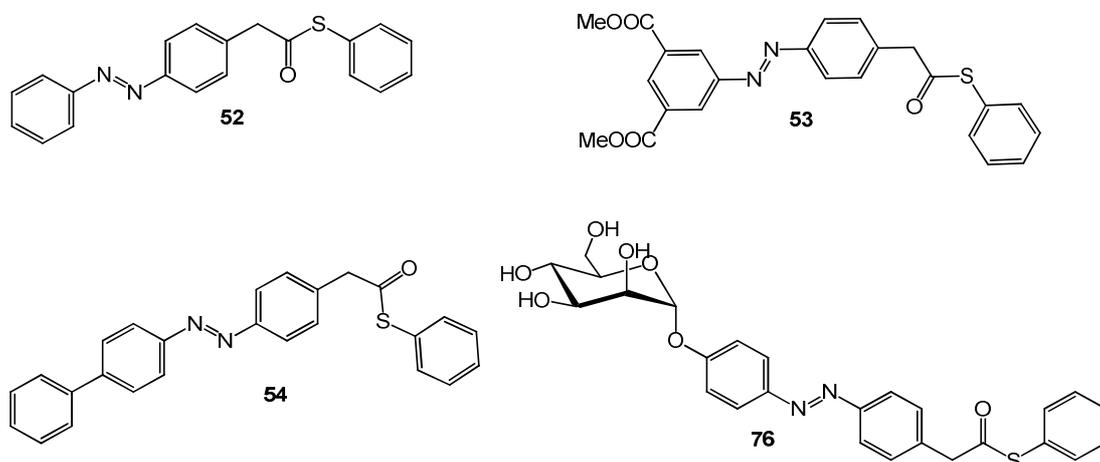


Abb. 78: Strukturen der für die DMAP-gesteuerten Ligation verwendeten Thioester.

Dabei wurde zu einer 17 μ M Lösung des Lektins in HEPES-Puffer einer der DMAP-Liganden in 2.5-fachen Überschuss zugegeben und die Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Lösung des entsprechenden Thioesters in Acetonitril ebenfalls im 2.5-fachen Überschuss zugegeben. Die Reaktion wurde daraufhin 3 h bei 25 °C geschüttelt, wobei aber in keinem Ansatz eine erfolgreiche Modifizierung von FimH detektiert werden konnte. Auch die Verwendung von Dimethylsulfoxid anstelle von Acetonitril, eine verlängerte Reaktionszeit von 4 h oder die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37 °C brachten kein markiertes Produkt hervor. Um daher zunächst einmal die für die Reaktion optimalen Bedingungen zu ermitteln, wurde für Vorversuche ein einfacheres System ausgewählt, dessen Komplexität Schritt für Schritt gesteigert wurde. Als erstes wurde 4-Hydroxybenzylalkohol (**HBA**) als Reaktionspartner bestimmt. Dazu wurde DMAP-Ligand **51** zusammen mit **HBA** und Thioester **52** für 3 h im Inkubator bei 37 °C geschüttelt. Als Kontrollreaktion wurde außerdem Thioester

52 mit **HBA** ohne DMAP-Ligand **51** inkubiert. Für eine spezifische Markierung der FimH-Bindungstasche ist die Reaktivität des Thioesters von Bedeutung. Ist diese zu hoch, könnte die Spezifität der Methode verringert werden. Für beide Reaktionen wurden Ligand **51** und Benzylalkohol **HBA** jeweils in Wasser mit pH 8 gelöst, der Thioester in so wenig DMSO, dass die Reaktionsmischung maximal 10 % an organischem Lösungsmittel enthielt. Nach der Reaktionszeit wurde die Lösung mittels MALDI-MS untersucht.

Das MS-Spektrum zeigte den eindeutigen Erfolg der Reaktion für die DMAP-katalysierte Reaktion (Spektrum siehe Anhang 6.1.2). Es wurden sowohl die Massen des einfach sowie des zweifach markierten Hydroxybenzylalkohols (**HBA**) gefunden. Für die Kontrollreaktion mit Thioester **52** war keine Modifikation des **HBA** detektierbar. Die nächste Überlegung war, das Konzept in einem supramolekularen Zusammenhang zu testen. Dazu sollte Thioester **76**^[110] mittels DMAP-Ligation auf eine Phenol-funktionalisierte Oberfläche fixiert werden. Da dieses Azobenzolderivat mit einer Mannoseeinheit funktionalisiert ist, wurde der Erfolg der Reaktion anhand einer positiven Bakterienadhäsion auf der Oberfläche verifiziert (Abb.79).

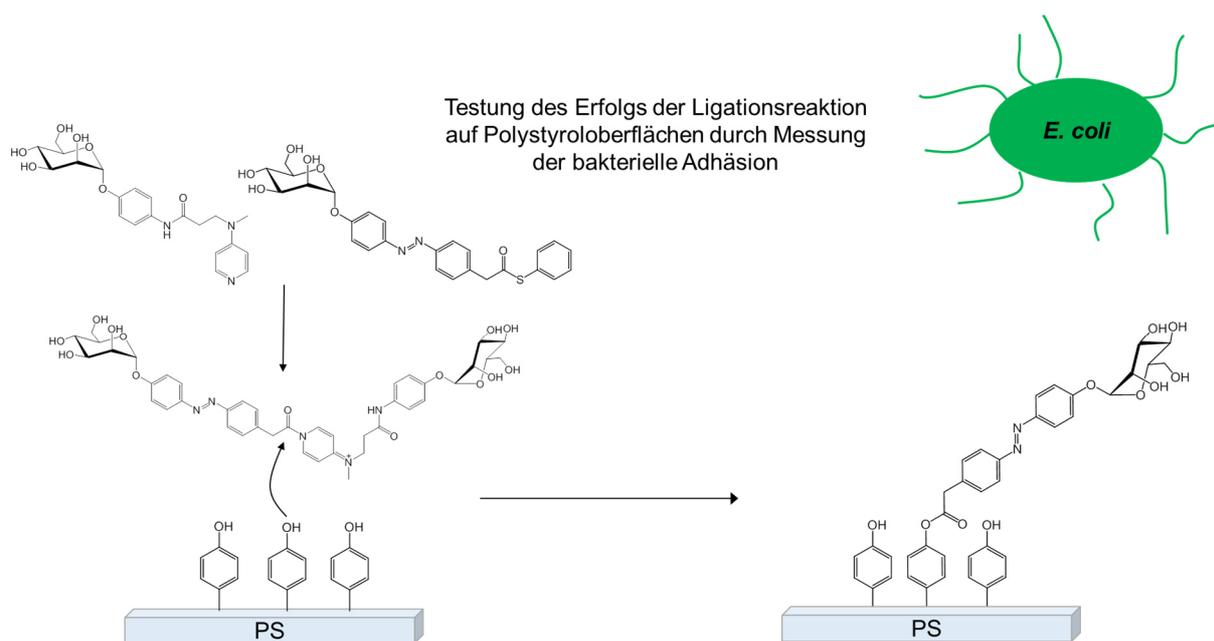


Abb. 79: Testung der DMAP-Ligation in einem supramolekularen Kontext durch Verwendung des Mannose-funktionalisierten Thioesters **76** und DMAP-Katalysator **51**.

Zunächst wurden Polystyrolplatten mit 4-Aminophenol funktionalisiert, so dass die phenolischen Hydroxygruppen als nukleophile Reaktionspartner für die Spaltung des Aktivesters fungieren. Im nächsten Schritt wurden DMAP-Ligand **51** und der Mannosid-funktionalisierte Thioester **76** in HEPES-Puffer (pH 8) auf die Platte pipettiert. Da die

Löslichkeit des Thioesters in wässriger Lösung gering war, wurde dieser in wenig DMSO gelöst, welches die Polystyrolplatte nicht angreift. Die Reaktion wurde bei 37 °C im Inkubator über Nacht geschüttelt. Als Kontrollreaktionen wurde außerdem jeweils eine Reihe der Mikrotiterplatte nur mit HEPES-Puffer und mit nur dem Thioester **76** bzw. nur dem DMAP-Liganden **51** inkubiert. Nach einigen Waschschrritten wurden schließlich GFP-exprimierende Bakterien auf die funktionalisierte Oberfläche gegeben und die Fluoreszenz bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden durch mehrfache Versuchsdurchführung verifiziert. Der Erfolg der DMAP-katalysierten Ligation konnte jedoch nicht zweifelsfrei bestätigt werden (Abb. 80).

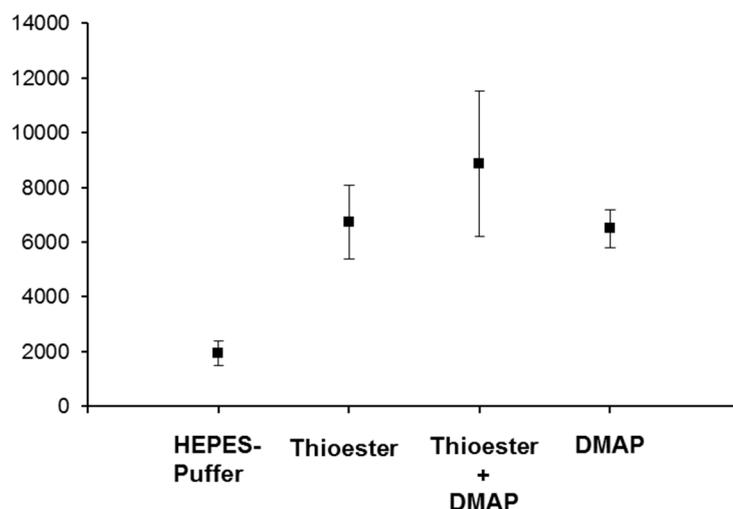


Abb. 80: Versuch der Oberflächenfunktionalisierung nach der DMAP-Methode mit Thioester **76** und Ligand **51** auf Aminophenol-funktionalisiertem Polystyrol. Die Graphik stellt die gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach bakterieller Adhäsion von *E. coli* an die Mannosid-funktionalisierte Oberfläche dar.

Zwar ist die Bakterienbindung für die Reaktionsreihe mit Ligand **51** und Thioester **76** am höchsten, jedoch zeigten auch beide Negativkontrollen mit **51** oder **76** einen höheren Wert im Vergleich zur Adhäsion der Bakterien auf der Phenol-funktionalisierten Oberfläche, welche auch nicht durch zusätzliche Waschschrritte erniedrigt werden konnte. Der Grund dafür liegt möglicherweise in unspezifischen Wechselwirkungen, welche die Mannoside **52** und **76** mit der Polystyroloberfläche ausbilden. Daher wurde im nächsten Schritt eine inerte Oberfläche für die Reaktion ausgewählt. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe TERFORT (Frankfurt) wurden Goldoberflächen mit Hydrochinon funktionalisiert. Dieses wurde über eine thioolfunktionalisierte Ethylenglycolkette auf die Metalloberfläche gebunden (Abb. 81). Die DMAP-vermittelte Reaktion bzw. die Kontrollreaktionen wurden wie vorher beschrieben durchgeführt. Auch im Fall der Goldoberfläche zeigten beide Kontrollreaktionen einen leicht erhöhten Wert der bakteriellen Adhäsion gegenüber der Adhäsion auf der funktionalisierten

Goldoberfläche. Allerdings ist die Bakterienbindung nach der Reaktion von Thioester **76** und Ligand **51** in diesem Fall deutlicher erhöht (Abb. 82). Der Grund für die jeweils erhöhte Bakterienbindung beider Kontrollreaktionen konnte nicht abschließend geklärt werden, die Tests auf beiden Oberflächen zeigten jedoch eine eindeutige Tendenz, so dass ein Erfolg der Ligationsreaktion angenommen wird.

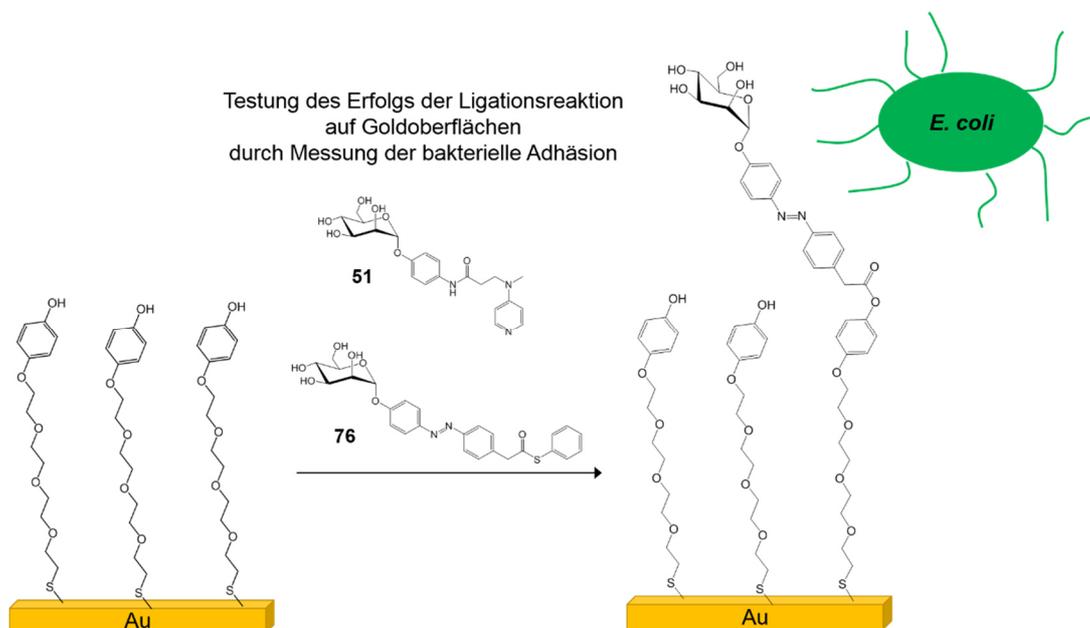


Abb. 81: DMAP-Ligationsversuch auf EG₄-Hydrochinon-funktionalisierter Goldoberfläche und anschließende Messung der bakteriellen Adhäsion.

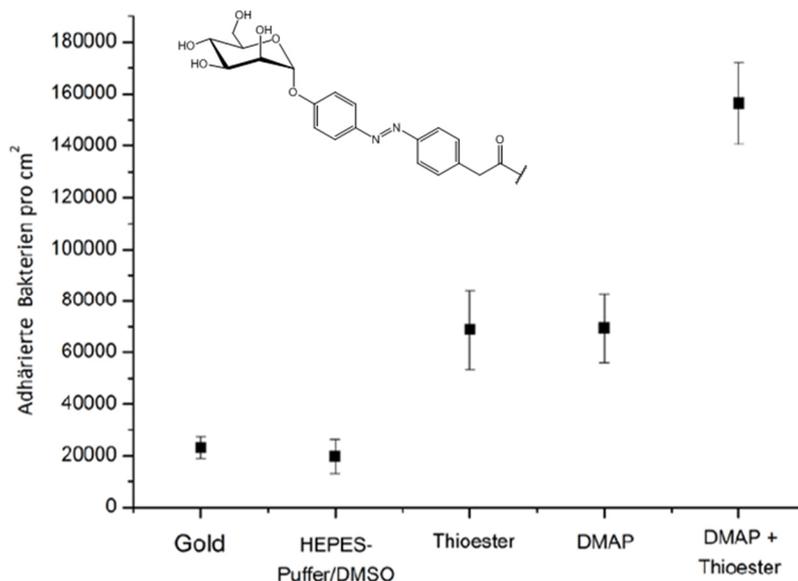


Abb. 82: Versuch der Oberflächenfunktionalisierung nach der DMAP-Methode mit Thioester **76** und DMAP-Ligand **51** auf einer EG₄-Hydrochinon-funktionalisierter Goldoberfläche. Gelingt die Ligationsreaktion, ist die Oberfläche mit dem Mannosid **76** funktionalisiert und *E. coli*-Bakterien können an diese binden. Die Datenpunkte geben an, wie viele Bakterien pro cm² auf der Goldoberfläche adhärirt haben.

Anschließend wurden weitere Versuche in Lösung unternommen. Von dem Modellsystem ausgehend wurde die Reaktivität verschiedener Aminosäuren getestet. Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, sollten möglichst die Aminosäuren Tyrosin und Threonin, die sich in der Nähe der Bindungstasche befinden, modifiziert werden. Daher wurden am *N*-Terminus Boc-geschütztes Tyrosin und Threonin für die Reaktion ausgewählt. Des Weiteren wurde auch noch Boc-Arginin untersucht, um dessen theoretisch angenommene geringe Reaktivität experimentell zu bestätigen. Eindeutig konnte hierbei eine Modifikation des Azobenzolderivats **52** am Tyrosin festgestellt werden. Für Threonin und Arginin dagegen war kein modifizierter Massenpeak detektierbar. Allerdings war die Auswertung nicht ganz eindeutig, da im Bereich der erwarteten modifizierten Molekülmassen viele andere Peaks im Spektrum sichtbar waren. Um daher eine Fehlinterpretation der Ergebnisse auszuschließen und dem Protein einen Schritt näher zu kommen, wurden als nächstgrößere Systeme drei verschiedene Peptide mit neun, zehn bzw. 14 Aminosäuren getestet (Abb. 83). Bei der Auswahl der Peptide wurde darauf geachtet, dass sie Aminosäuren in ihrer Sequenz enthalten, welche sich auch im FimH wiederfinden und dort als potentielle Nukleophile zur Verfügung stehen. Im Vergleich zu vorherigen Versuchen wurde die Reaktionslösung sehr konzentriert angesetzt (Kapitel 5.4). Alle drei Peptide wurden zunächst per MALDI-MS untersucht, wobei eine erfolgreiche Markierung für alle drei festgestellt werden konnte. Allerdings gelang dieses erst nach Verlängerung der Reaktionszeit von drei auf zwölf Stunden. Die Effizienz der Markierungsreaktion war stark abhängig von dem jeweiligen Peptid. **M6** zeigte dabei den höchsten Umsatz der Modifikation, wohingegen das **Glu-Fib**-Peptid wie erwartet kaum reagierte. In dessen Aminosäuresequenz finden sich bis auf den *N*-Terminus des Peptids und einem sterisch schlecht zugänglichen Serin, keine weiteren potentiellen Nukleophile.

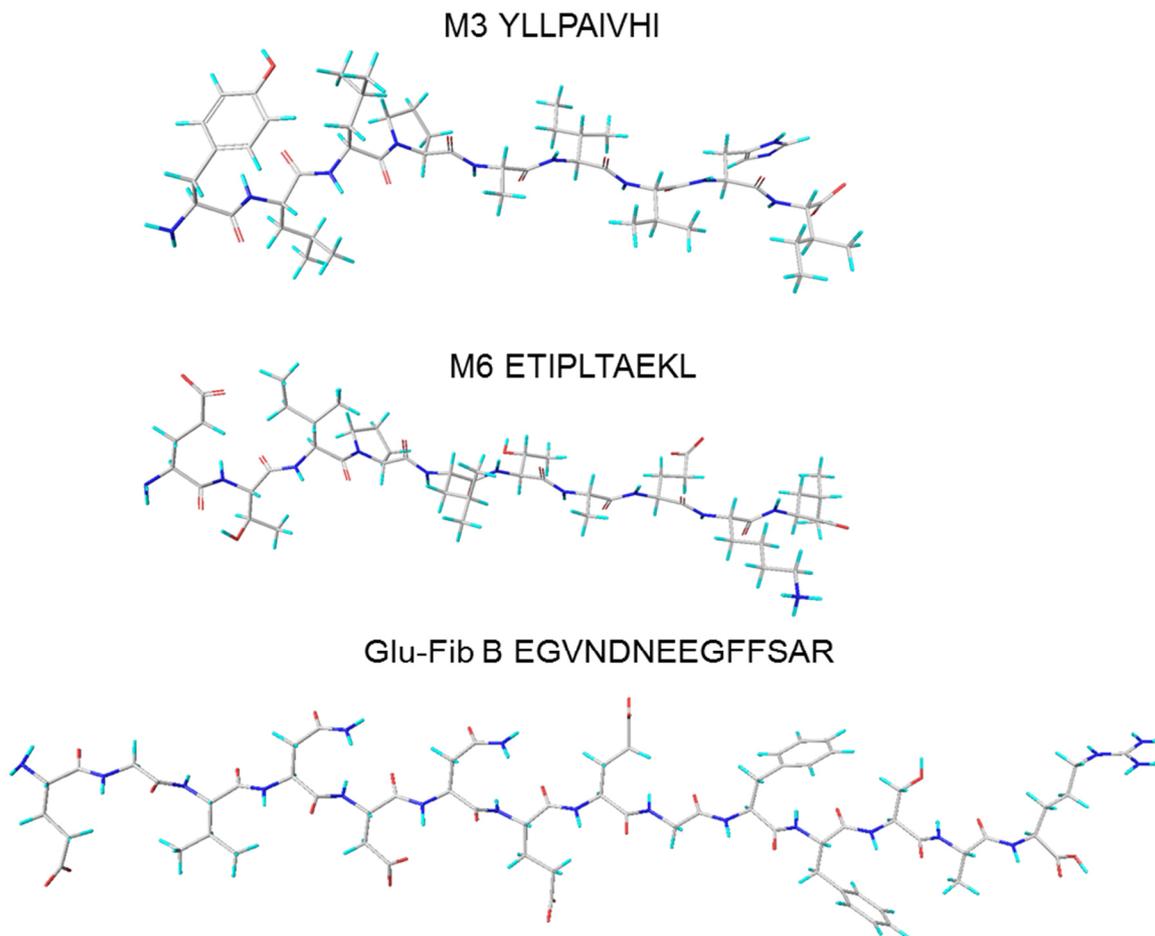


Abb. 83: 3D-Strukturen der Modellpeptide **M3**, **M5** und **Glu-Fib B**, welche in Vorversuchen zur FimH Modifizierung ausgewählt wurden.

Die Peptide **M3** und **M6** wurden anschließend genauer im ESI-MS untersucht und die Positionen der gefundenen Modifikationen durch MS/MS-Sequenzierung identifiziert. Fragmentierungen im MS/MS-Experiment treten bei Peptiden wie in Abb. 84 veranschaulicht überwiegend an den Peptidbindungen auf. Dabei ergeben sich Fragmente der *N*-terminalen Serie, welche mit a, b und c bezeichnet werden und Fragmente der *C*-terminalen Serie, die dagegen mit x, y und z beschriftet werden. Diese Nomenklatur ist etabliert und geht auf ROEPSTORFF, OHLMAN und BIEMANN zurück.^[111]

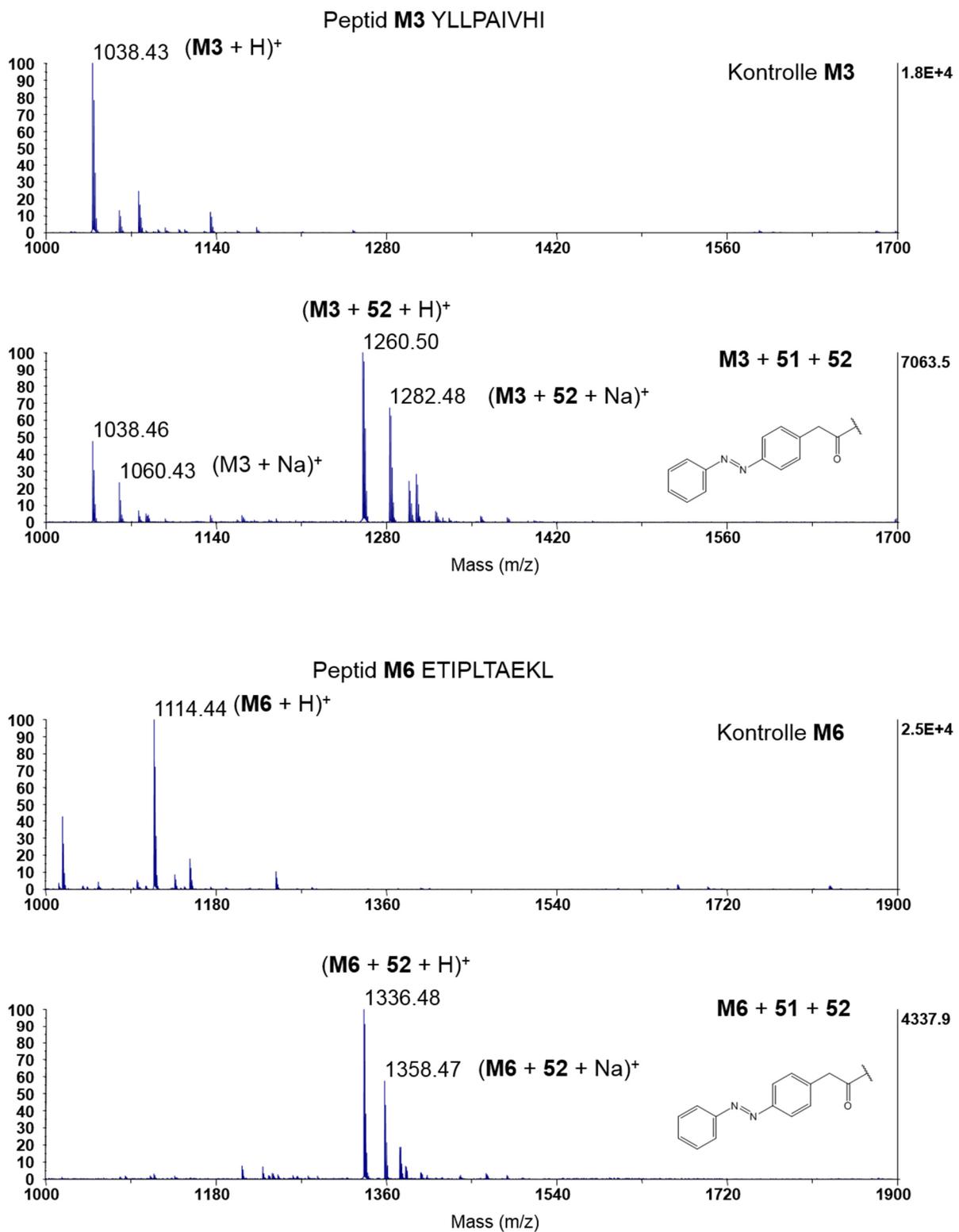


Abb. 84: MALDI-MS-Spektren der Peptide **M3** und **M6** vor und nach der Reaktion mit Ligand **51** und Thioester **52** in HEPES-Puffer (pH-Wert = 8) mit 50 % Acetonitril.

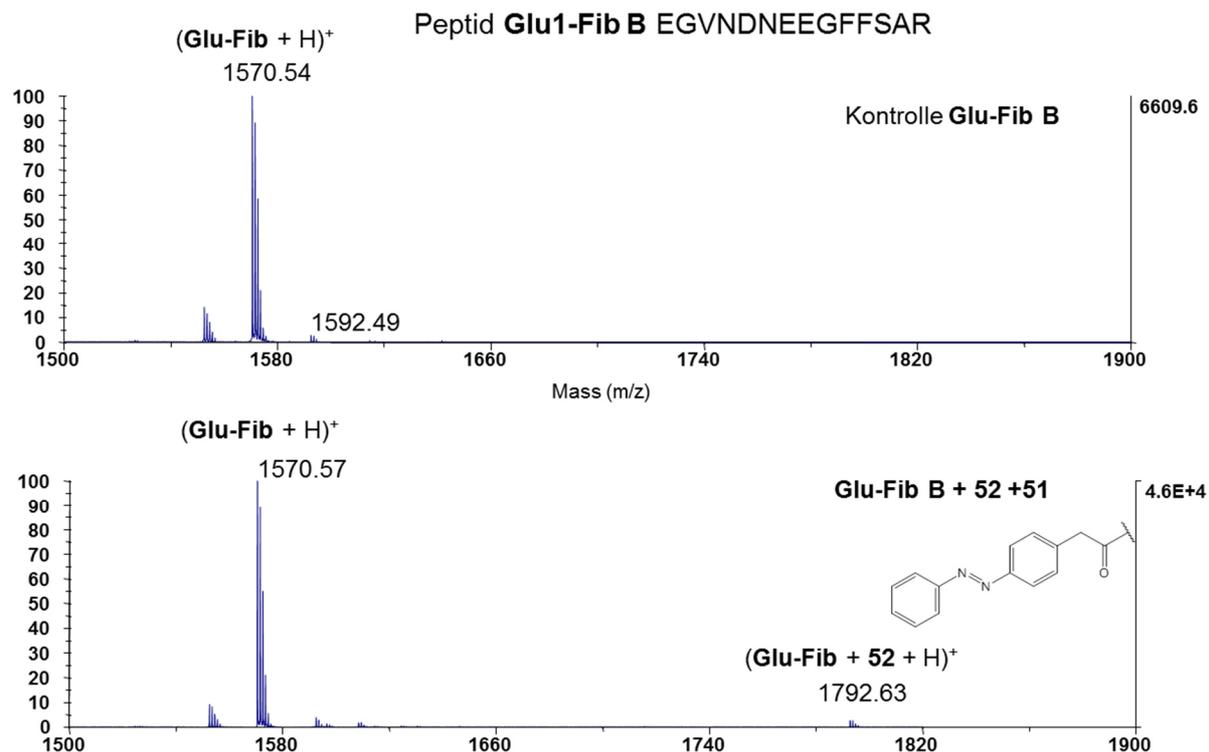


Abb. 85: MALDI-MS-Spektren des Peptids **Glu-Fib B** vor und nach der Reaktion mit Ligand **51** und Thioester **52** in HEPES-Puffer (pH-Wert = 8) mit 50 % Acetonitril.

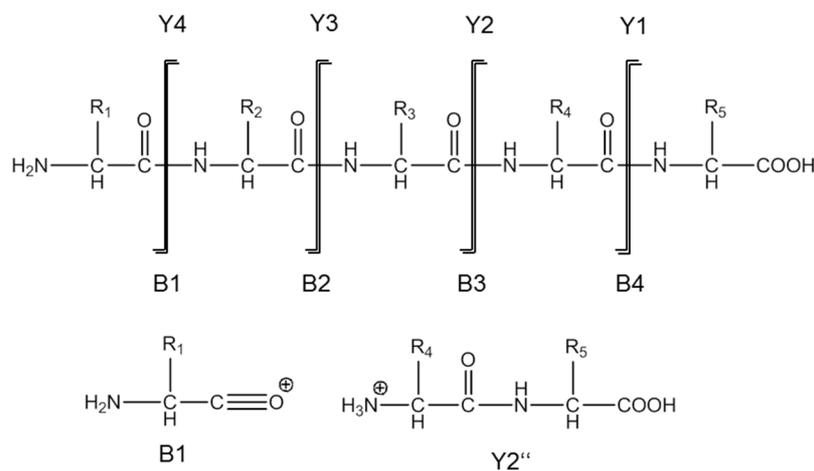


Abb. 86: Darstellung der Fragmente, die durch MS/MS-Spektroskopie von Peptiden erhalten werden.

Im ESI-MS-Massenspektrum konnten für die Reaktion mit **M3** Peptidmoleküle mit einfacher und zweifacher Azobenzolmodifikation identifiziert werden. Beide zugehörigen Massenpeaks wurden genauer mit MS/MS-Spektroskopie untersucht. Im Fall der einfachen Modifizierung konnte eindeutig eine Bindung des Azobenzolderivats **52** am endständigen Tyrosin festgestellt

werden, da die Y-Fragmente 1-8 auf keine Modifizierung schließen lassen (Abb. 87). Fragment b1 dagegen weist die modifizierte Masse eines ionisierten Tyrosinfragments mit gebundenem Azobenzolderivat **52** auf. Anhand dieser Fragmentierungsmethode kann allerdings nicht geschlossen werden, ob die Modifizierung am freien *N*-Terminus oder an der Hydroxylgruppe des Tyrosins stattgefunden hat. Das MS/MS-Spektrum der zweifachen Modifizierung dagegen beweist, dass beide Fälle möglich sind. Auch hier ergaben sich für die Y-Fragmente keine Unterschiede zum ursprünglichen Peptid. Alle b-Fragmente dagegen zeigten zusätzlich die doppelte Molekülmasse des Azobenzolfragments von **52** (Abb. 88). Bei der MS/MS-Analyse von **M6** ergab sich dagegen eine komplexere Mischung des einfach modifizierten Peptids (Spektrum siehe Anhang 6.1.2). Zweifelsfrei konnten Modifikationen am *N*-Terminus und an der Seitenkette von Lysin identifiziert werden (Abb. 89). Diese Ergebnisse lassen sich für den *N*-Terminus aus dem Fragment b1 ablesen, welches der Masse eines Glutaminsäurefragments und eines Azobenzolderivats **52** entspricht und aus dem Y2-Fragment für die Modifikation am Lysin, welches der Masse des Leucin-Lysin Peptidfragments mit einer Azobenzoleinheit **52** zuzuordnen ist. Eine Modifikation der beiden Threonine 2 und 6 kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, scheint aber gegenüber der Reaktion mit den Aminofunktionalitäten nicht bevorzugt zu sein. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Reaktion mit den eingesetzten Edukten sicher funktioniert und auch in einem biologischen System an Amino- und Hydroxylgruppen möglich ist. Für bioorthogonale Reaktionen ist es durchaus üblich einen Anteil an organischen Lösungsmitteln zur besseren Löslichkeit der einzuführenden Moleküle zuzugeben. In diesem Fall wurde Acetonitril ausgewählt, häufig findet allerdings auch Dimethylsulfoxid Anwendung. Für die Optimierung und zur weiteren Untersuchung des Systems wurde mit den bekannten Peptiden in Bezug auf eine mögliche Ausbeutensteigerung die Verwendung von Acetonitril der von Dimethylsulfoxid gegenübergestellt. Sowohl in Acetonitril als auch in Dimethylsulfoxid konnte eine erfolgreiche Modifizierung der Peptide festgestellt werden, allerdings war die Modifikationsrate für die Peptide **M3** und **M6** mit Acetonitril eindeutig höher, was wahrscheinlich auf eine bessere Löslichkeit des verwendeten Thioesters **52** in Acetonitril zurückzuführen ist. (Spektren siehe Anhang 6.1.2). Eine Übereinstimmung der Ergebnisse für die Verwendung anderer Thioester muss noch überprüft werden. Zusätzlich wurde die Reaktivität des Thioesters **52** ohne die Katalyse des DMAP-Mannosids **51** getestet. Die Kontrollreaktion der nicht katalysierten Thioesterreaktion wurde in Dimethylsulfoxid durchgeführt. **M3** und **M6** reagierten beide auch ohne DMAP-Katalysator **51**

mit dem Thioester **52**. Im Fall von **M6** konnte der Umsatz innerhalb der Reaktionszeit jedoch durch die Katalyse verdoppelt werden (Abb. 90).

MS/MS von **M3** YLLPAIVHI- einfache Modifizierung

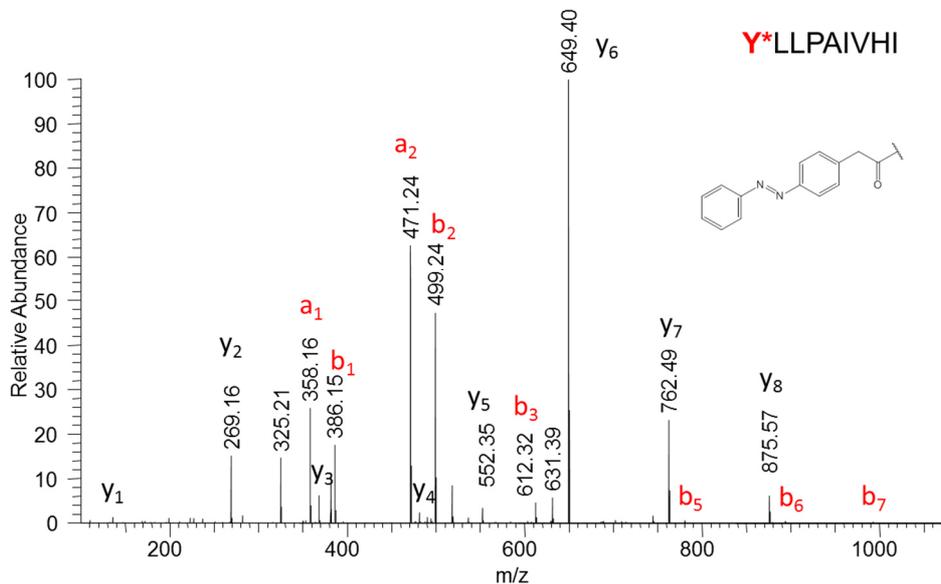


Abb. 87: MS/MS-Spektrum des Peptids **M3** für die einfach-modifizierte Peptidmasse. Fragment b1 weist auf eine Bindung des Azobenzolderivats **52** an Tyrosin (Y) hin.

MS/MS von **M3** YLLPAIVHI- zweifache Modifizierung

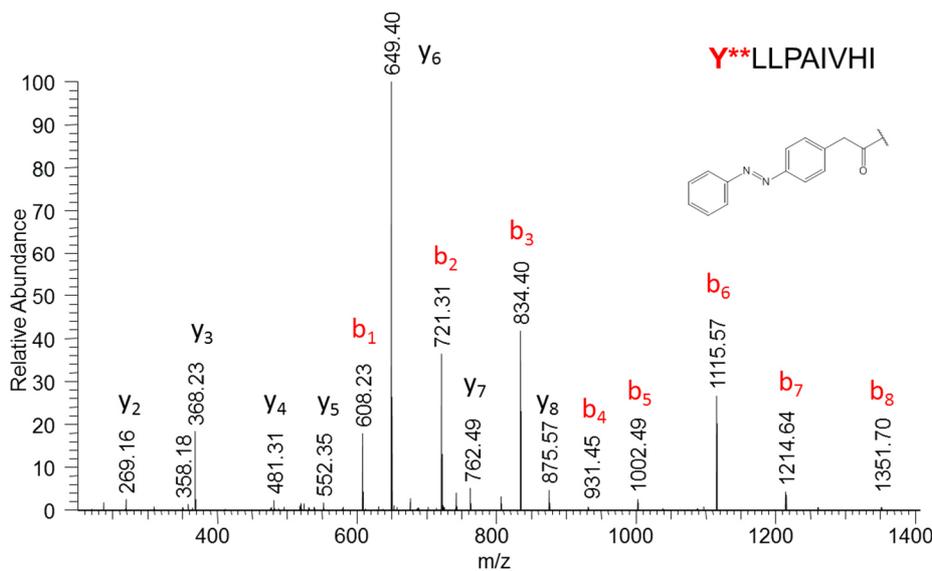


Abb. 88: MS/MS-Spektrum der zweifach-modifizierten Peptidmasse von **M3**. Fragment b1 bestätigt die Bindung zweier Azobenzolderivate **52** an das endständige Tyrosin (Y). Die Modifizierung ist sowohl am *N*-Terminus, als auch an der Hydroxygruppe des Tyrosins lokalisiert.

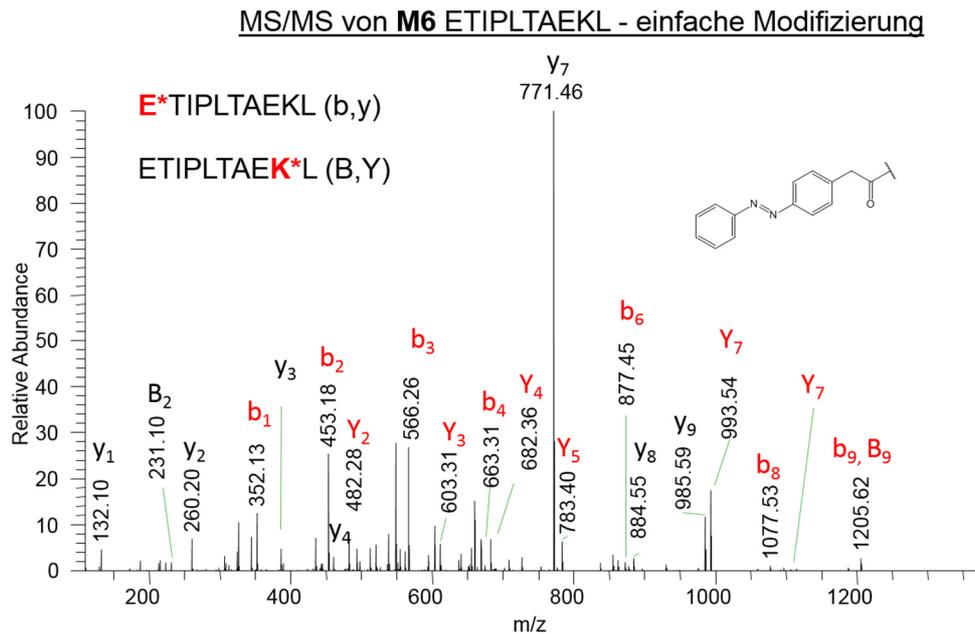


Abb. 89: MS/MS-Spektrum der einfach-modifizierten Peptidmasse von **M6**. Modifikationen wurden am *N*-Terminus (b1-Fragment) sowie an Lysin (Y2-Fragment) identifiziert.

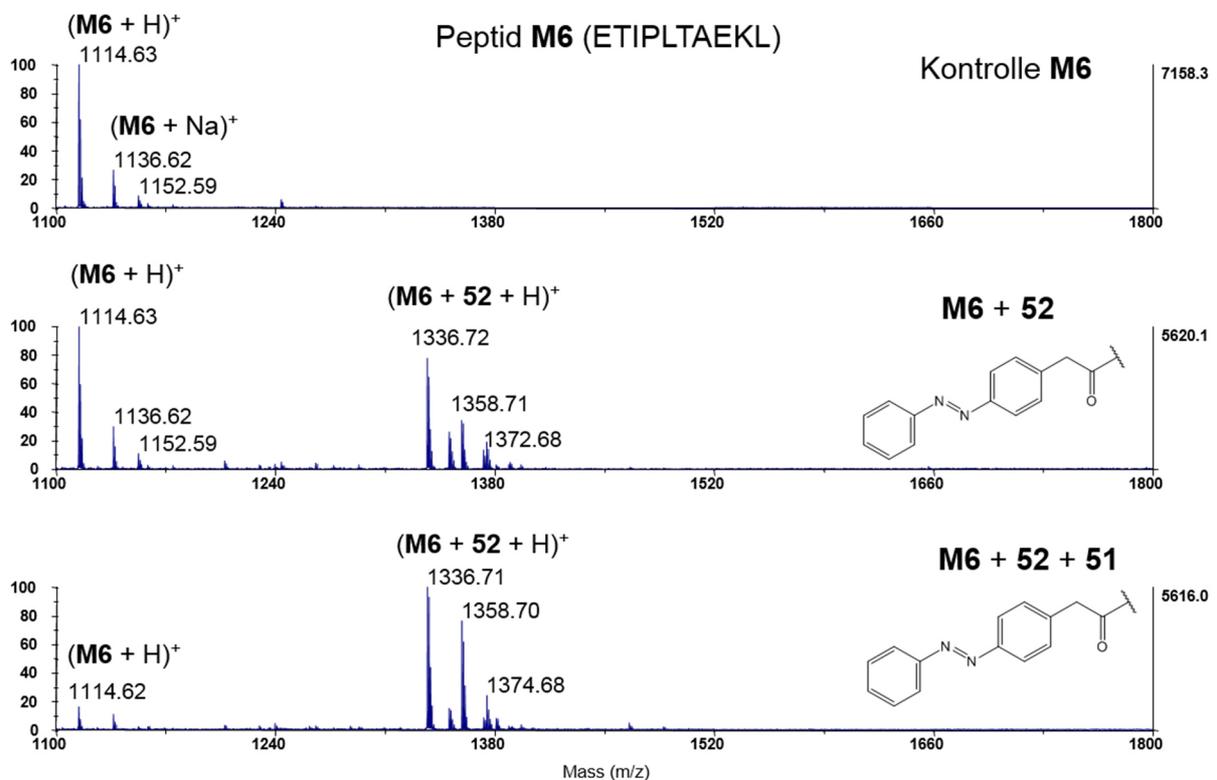


Abb. 90: MALDI-MS-Spektren des Peptids **M6** ohne Reaktion (oben), nach Reaktion mit dem Azobenzolthioester **52** (Mitte) und nach Reaktion mit Azobenzolthioester **52** und DMAP-Katalysator **51** (unten) in 50 % DMSO.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden nun auf die Versuchsdurchführung mit FimH_{tr} angewandt. Mit einer verlängerten Reaktionszeit, eines fünffachen Überschusses der Reagenzien **51** und **52**, einer konzentrierteren Lösung (21 µM) und mit 50 %iger Acetonitrilzugabe für die bessere Löslichkeit des Thioesters **52** konnte schließlich eine Modifikation von FimH_{tr} nachgewiesen werden (Abb. 91). Bis zu vier Azobenzoleinheiten an einem Proteinmolekül wurden dabei detektiert. Um herauszufinden, wo die Modifikationen stattgefunden haben, wurde die Proteinmischung mit Pepsin einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen. Das Enzym spaltet das Protein in unterschiedliche Peptidfragmente, die anschließend durch MS/MS-Sequenzierung nach Modifikationen abgesucht wurden. Das Azobenzolderivat **52** wurde an dem an der Bindungstasche lokalisierten TYR137 identifiziert (Tab. 12). Des Weiteren wurde die Modifikation aber auch an Aminosäureresten gefunden, welche sich weiter entfernt von der Bindungstasche befinden. Unspezifische Reaktionen wurden dabei an verschiedenen Lysinen und an einem Serin identifiziert, deren Positionen in Abb. 92 hervorgehoben sind.

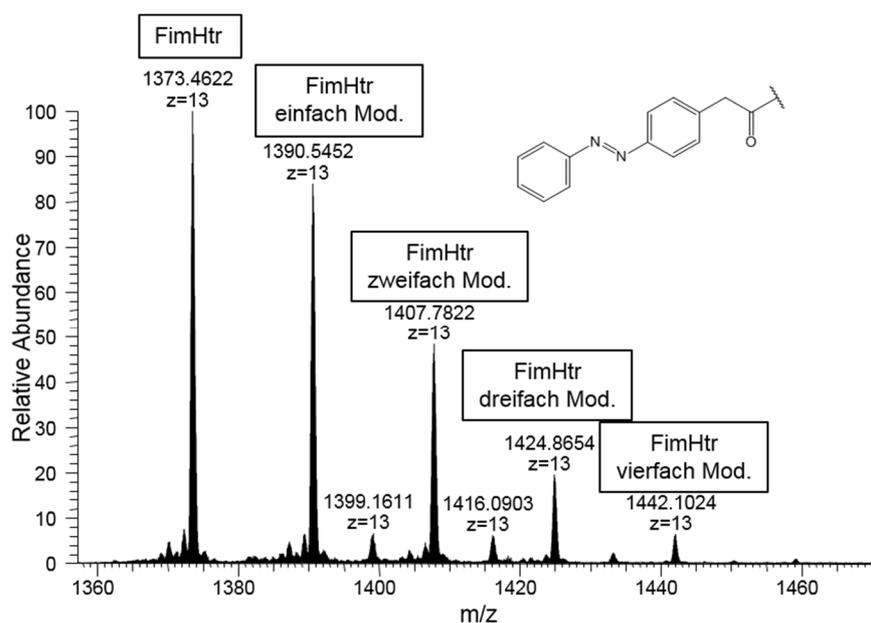


Abb. 91: ESI-MS-Spektrum der erfolgreichen FimH_{tr}-Modifizierung mit Thioester **52** und DMAP-Ligand **51**. Es wurde Proteinmassen mit bis zu vier Modifikationen an einem Protein detektiert (**FimH-V1**).

ERGEBNISSE

Tab. 12: Zusammenstellung der modifizierten Peptide, die aus der enzymatischen Hydrolyse der FimH_{tr}-Mischung (**FimH-V1**) identifiziert werden konnten. Es wurden Modifikationen von **52** an SER62, LYS76, LYS101, LYS121 und TYR137 identifiziert.

Aminosäure Start	Sequenz	Aminosäure Ende	Modifikation	Mod. Nr. im Protein	MH+ [Da]
61	GSAYGGVLSNFSGTVK	76	S2(52)	62	1765.8549
61	GSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPR	92	K16(52)	76	3523.6454
99	TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK	121	K3(52)	101	2592.3885
107	LYLTPVSSAGGVAIKAG	123	K15(52)	121	1826.0019
108	YLTPVSSAGGVAIKAG	123	K14(52)	121	1712.9151
130	ILRQTNNYNSDD	141	Y8(52)	137	1674.7508
132	RQTNNYNSDD	141	Y6(52)	137	1448.5845

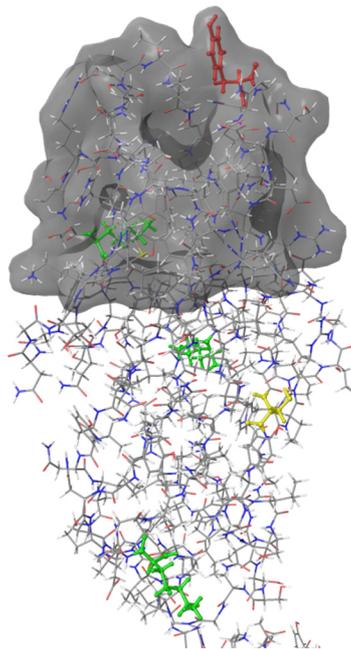


Abb. 92: Modifikationen von FimH_{tr} mit Azobenzolderivat **52** wurden per MS/MS-Spektroskopie an TYR137 (rot), SER62 (gelb) und an LYS121, 101 und 76 (grün) identifiziert. Das Bild wurde mit *Maestro*^[23] aus dem Programmpaket Schrödinger erstellt.

Ein hoher Anteil an organischem Lösungsmittel kann in Bezug auf die Dynamik des Proteins einige Schwierigkeiten mit sich bringen. Proteine sind in wässriger Lösung gefaltet und bilden viele Wasserstoffbrückenbindungen aus. Bei der Verwendung von organischen Lösungsmitteln könnten sich die strukturellen Eigenschaften des Proteins daher ändern, was die Selektivität der gewählten Methode beeinflusst. Sollte das Protein beispielsweise bei den gewählten Reaktionsbedingungen entfaltet vorliegen, ist keine Bindungstasche mehr vorhanden, so dass eine affinitätsgesteuerte Reaktion nicht mehr selektiv stattfinden kann. Im Fall von FimH ist außerdem zu beachten, dass das Wassermolekül, welches sich in der Bindungstasche befindet, einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung des Kohlenhydratliganden ausübt. Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln ohne wässrigen Anteil ist daher zu vermeiden. Um die Reaktion zu optimieren und zu testen, welche Konzentration von Acetonitril die höchste Ausbeute der Reaktion liefert, wurde der erfolgreiche Versuch mit variiertem Acetonitrilanteil von 10, 20, 30 bzw. 50 % wiederholt (Abb. 93). Zusätzlich wurden alle Versuche ohne Zusatz des DMAP-Liganden **51** durchgeführt, um die Reaktivität des Thioesters **52** mit FimH_{tr} ohne Katalyse abzuschätzen. Um außerdem unspezifische Reaktionen zu vermeiden, wurden die Proben nach der Reaktionszeit bis zur massenspektrometrischen Analyse eingefroren. Tatsächlich wurde die Modifikationsrate durch diesen Schritt leicht erniedrigt. Bei der Betrachtung der Spektren in Bezug auf das Lösungsmittelverhältnis fällt auf, dass mit steigendem Acetonitrilanteil wie erwartet eine höhere Markierungsausbeute erreicht wird. Außerdem war die Reaktivität des katalysierten Thioesters **52** deutlich erhöht. Die Reaktion mit 30 % Acetonitril zeigt in diesem Ansatz die höchste Modifikationsrate.

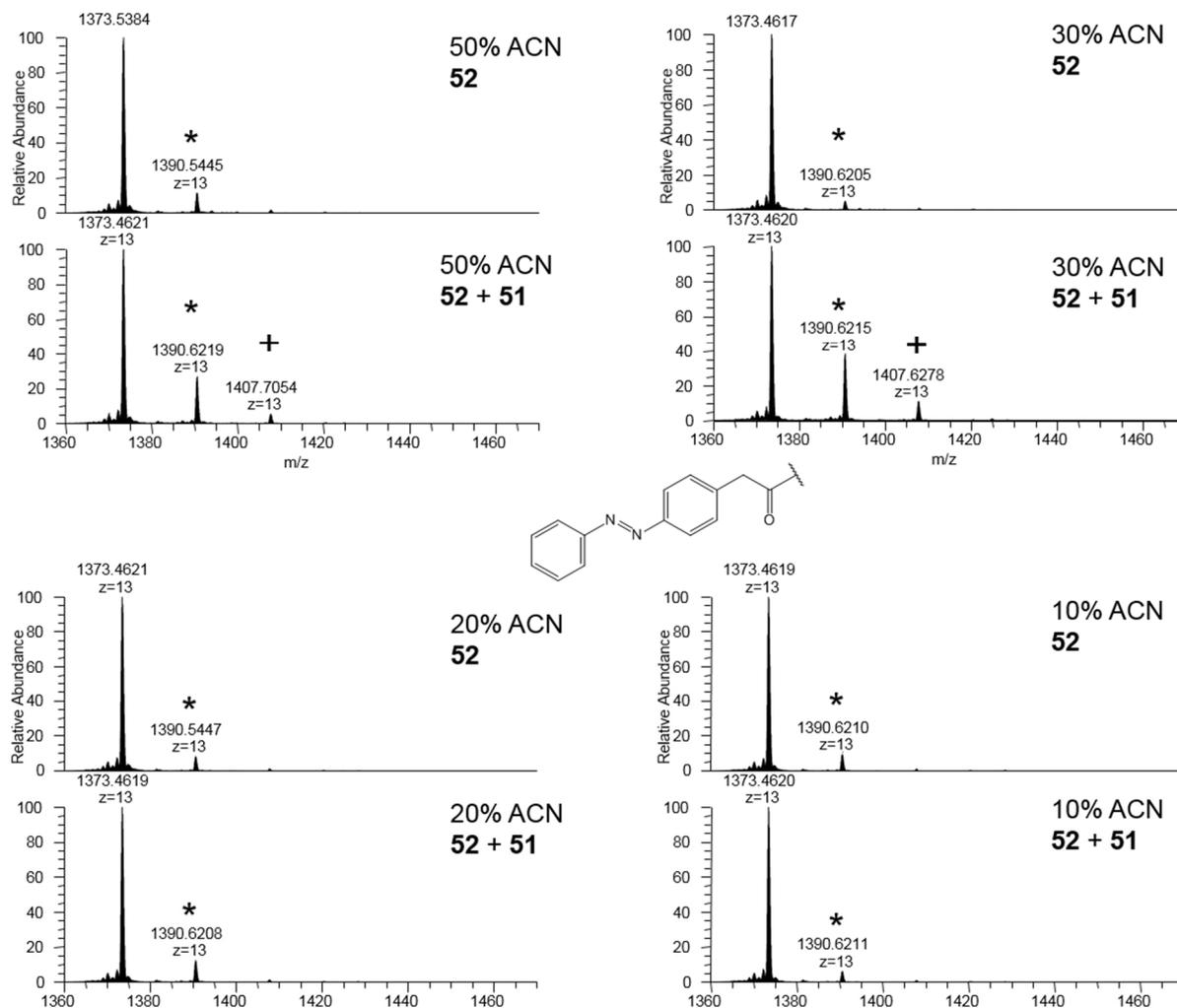


Abb. 93: Ergebnis der DMAP-katalysierten Reaktion von DMAP-Mannosid **51** und Thioester **52** mit FimH_{tr} unter Verwendung unterschiedlicher Anteile an Acetonitril (10-50 %) im Puffersystem. Außerdem wurde die Reaktivität des Thioesters mit und ohne Zugabe des DMAP-Derivates **51** gegenübergestellt. Die Abbildung zeigt das jeweilige ESI-MS-Spektrum; der Peak bei $m/z = 1373$ entspricht dem nicht modifizierten FimH_{tr}.

Um den Einfluss des organischen Lösungsmittels auf FimH_{tr} zu untersuchen und um damit die bisher erzielten Ergebnisse besser bewerten sowie optimieren zu können, wurde die Faltung des Proteins per NMR-Spektroskopie untersucht. Dazu wurden eindimensionale ¹H-Spektren für das FimH_{tr} in wässriger Lösung mit 0, 10, 20, 30, 40 und 50 % Acetonitrilanteil gemessen. Ist die Faltung aktiv, sind in der Hochfeldregion viele ausgeprägte Resonanzen vorhanden. Im Bereich von 0-30 % Acetonitrilanteil sind die Peaks in den Spektren sehr ausgeprägt, was eine vollständig intakte Faltung indiziert (Abb. 94). Darüber hinaus sind die Spektren durch die Messmethodik bedingt nicht mehr besonders gleichmäßig, aber auch hier sind Peaks im Hochfeldbereich weiterhin deutlich zu sehen, so dass eine vorhandene Faltung des Proteins in allen Mischungsverhältnissen angenommen wird. Ein genauerer Blick auf die Hauptregion der

Methylgruppen um 1 ppm lässt schließlich doch kleine Verschiebung der Signale erkennen, was darauf hindeuten könnte, dass sich die Dynamik und Struktur des Proteins in kleinen Anteilen ändert. Aufgrund der starken Änderung in der äußeren Umgebung ist das jedoch auch zu erwarten gewesen. Wichtig allerdings ist, dass die globale Faltung und so auch die Bindungstasche von FimH auch mit einem erhöhten Anteil des organischen Lösungsmittels intakt bleiben.

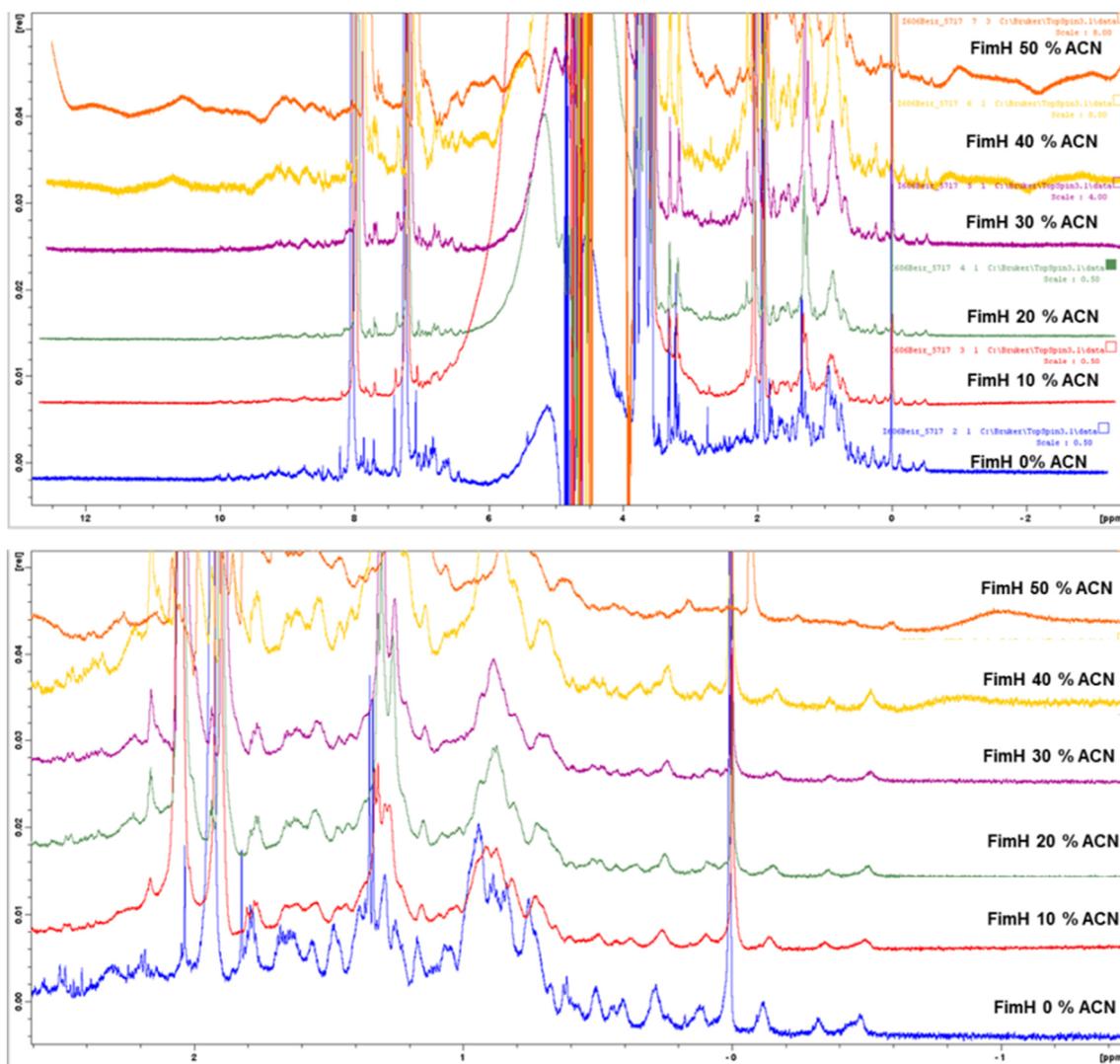


Abb. 94: NMR-Spektren des Proteins FimH_{tr} in wässriger Lösung mit steigendem Acetonitrilanteil. Das untere Bild zeigt den Ausschnitt von -1.5 - 2.5 ppm aus dem oberen Übersichtsspektrum. Viele deutliche Signale im Hochfeldbereich sind charakteristisch für die Faltung eines Proteins, die für das FimH bis 30 % Acetonitrilanteil eindeutig und darüber hinaus sehr wahrscheinlich intakt ist.

Unter Verwendung der zuvor optimierten Reaktionsbedingungen galt es schließlich die Modifikation von FimH_{tr} mit weiteren Thioestern zu testen. Die Azobenzolderivate **53**, **54** und **76** wurden daraufhin für die Reaktion in Kombination mit dem DMAP-Liganden **51** verwendet.

ERGEBNISSE

Da der optimale Anteil an organischem Lösungsmitteln für die Reaktion mit der Löslichkeit des jeweiligen Thioesters zusammenhängt, wurde die optimale Lösungsmittelzusammensetzung für die übrigen Azobenzolverbindungen bestimmt. Thioester **53** und **54** wurden jeweils mit 20, 30 und 50 % Acetonitrilanteil eingesetzt. Das Mannosid **76** dagegen war in Acetonitril und Wasser nur schwer löslich, weshalb neben 50 % Acetonitrilanteil zusätzlich eine Reaktion mit 10 % Dimethylsulfoxid getestet wurde. Alle Thioester konnten an das FimH_{tr} gebunden werden. Für die Reaktion mit Azobenzolderivat **53** konnte in diesem Ansatz durch MS/MS-Sequenzierung der Peptidfragmente nach der enzymatischen Hydrolyse erneut TYR137 als Markierungsort nachgewiesen werden (Abb. 95). In diesem Fall wurde keine unspezifische Modifikation in weiterer Entfernung der Bindungstasche identifiziert. Für die Versuche der anderen Thioester **54** und **76** konnte die Bindungsposition mit der gewählten Methode in diesem Versuch zunächst nicht bestimmt werden.

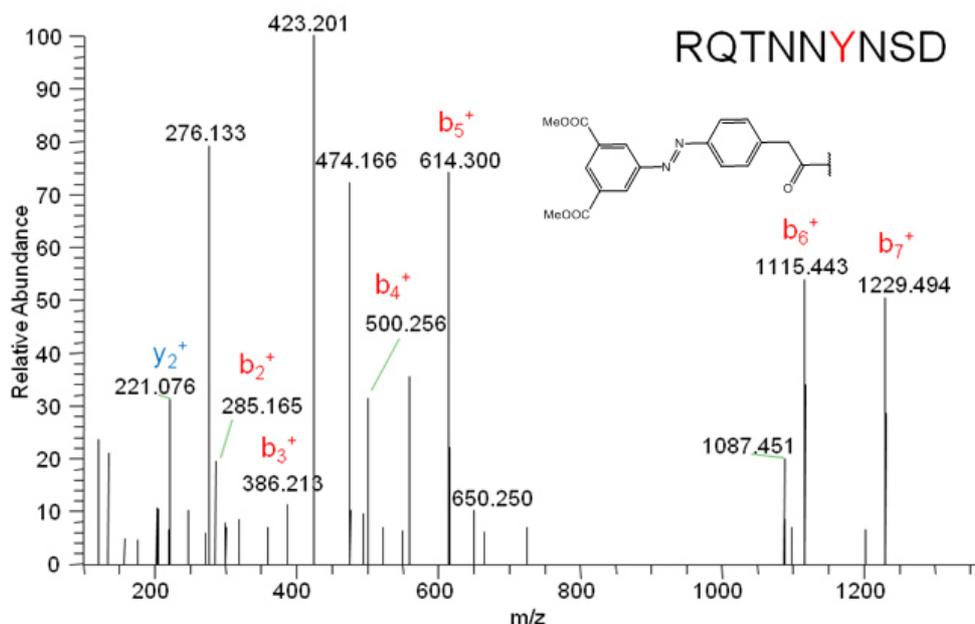


Abb. 95: MS/MS-Sequenzierung eines modifizierten Peptidfragments, welches nach enzymatischer Hydrolyse des FimH_{tr} mit Pepsin erhalten wurde. Die Modifikation des Thioesters **53** wurde zwischen b₅ und b₆ am TYR137 identifiziert (**FimH-V2**).

Da bei der Reaktion sehr viele Details entscheidend sind, wurde die Modifikationsreaktion aller Thioester, in Hinblick auf eine gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, noch einmal in einem zeitgleichen Ansatz getestet. Thioester **52**, **53** und **54** wurden in 30 % Acetonitril und Thioester **76** in 10 % DMSO jeweils in Kombination mit DMAP-Ligand **51** mit

FimH_{tr} umgesetzt. Nach 11 h Reaktionszeit wurden die Proben eingefroren, anschließend mit Pepsin verdaut und mittels MS/MS-Sequenzierung untersucht. Erneut gelang die Modifikation von FimH_{tr} mit allen verwendeten Proben. Die Peptidfragmente wurden auf Modifikationen der Aminosäuren TYR, THR, SER, LYS und des *N*-Terminus hin untersucht. Die markierte Aminosäure wurde im Fall der Thioester **52**, **53** und **76** jeweils ausschließlich am TYR137 identifiziert, obwohl zum Teil auch mehrfache Modifikationen im ESI-MS-Massenspektrum bestimmt wurden.

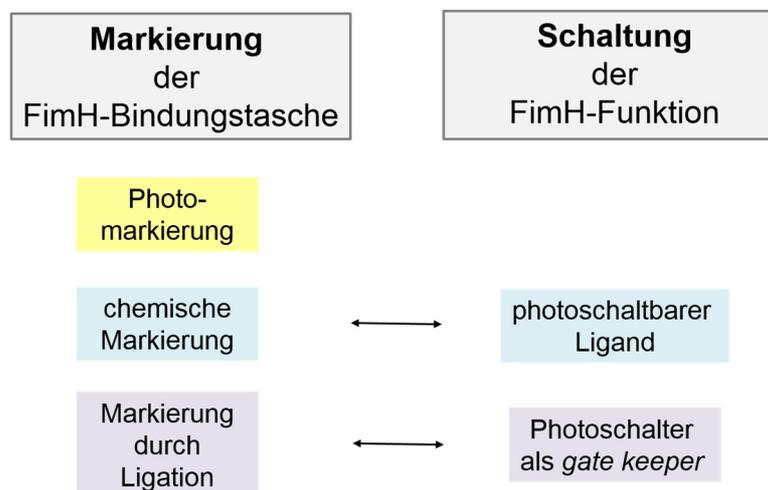
Tab. 13: Auflistung aller verwendeten Thioester für die DMAP-vermittelte Ligation, katalysiert durch Ligand **51**. Unter dem Punkt Modifikation ist der jeweilige Massenunterschied zum natürlichen FimH_{tr} angegeben. Zusätzlich ist die durch MS/MS-Analyse detektierte Aminosäure angegeben.

Thioester	DMAP-Ligand	Masse der Modifikation (Da)	Anzahl der Modifikationen	Modifizierte Aminosäure
52	51	222	2	TYR137
53	51	338	2	TYR137
54	51	298	1	n. identifiziert
76	51	400	2	TYR137

Zusammenfassend betrachtet wurde eine Modifikation von FimH_{tr} mit Hilfe der DMAP-gesteuerten Markierungsmethode mit allen getesteten Thioestern **52**, **53**, **54** und **76** in Kombination mit DMAP-Mannosid **51** erreicht. Die Ausbeute der Markierungsreaktion war dabei stark abhängig von der Lösungsmittelzusammensetzung der Reaktion bzw. von der Löslichkeit der einzelnen Thioester in der Reaktionsmischung. Für die Thioester **52**, **53** und **76** konnte in einem finalen Versuch durch MS/MS-Sequenzierung jeweils TYR137 als Markierungsposition bestimmt sowie die Reproduzierbarkeit der erarbeiteten Methode erwiesen werden. Die spezifische Modifizierung an TYR137 unabhängig des verwendeten Thioesters könnte zukünftig auch die Optimierung der Azobenzolderivate vereinfachen, so dass die Schaltung der FimH-Funktion in naher Zukunft mit dieser Methode möglich wird.

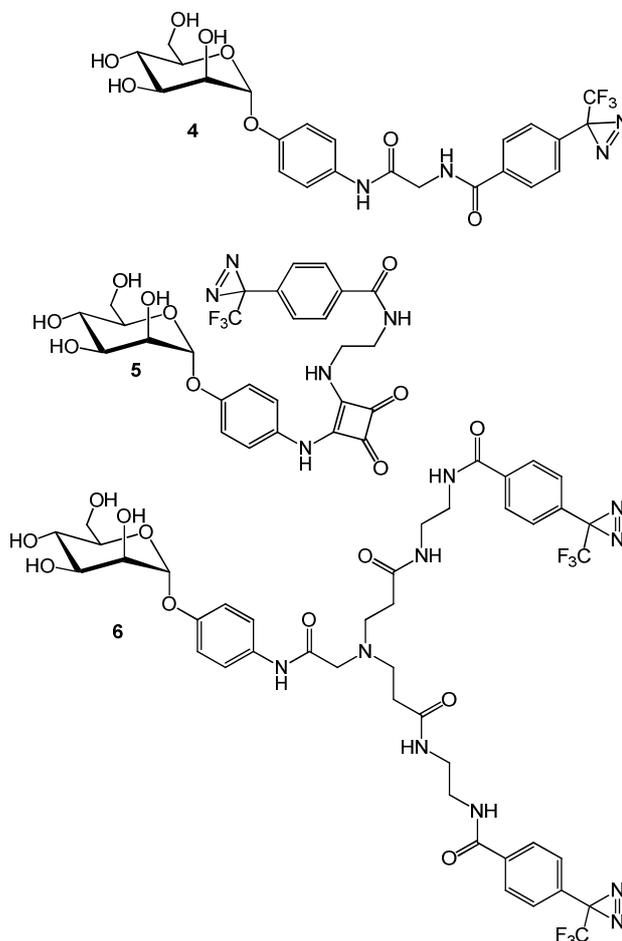
4 Zusammenfassung und Ausblick

Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen stehen im direkten Kontext bakterieller Infektionen, welche ein zunehmend großes Gesundheitsproblem darstellen. Für eine effektive Wirkstoffentwicklung ist es von entscheidender Bedeutung, den molekularen Mechanismus dieser Interaktionen im Detail zu verstehen. Zudem könnte der dringend notwendige Strategiewechsel für die Bekämpfung bakterieller Infektionen im Zusammenhang mit der gezielten Kontrolle des Adhäsionsprozesses stehen. Bakterieneigene Lektine vermitteln die Adhäsion der Bakterienzellen an die glycosylierte Zelloberfläche. Für die Untersuchung dieser Wechselwirkungen auf molekularer Ebene wurden Typ-1-fimbrierte *E. coli*-Zellen bzw. dessen adhäsives Lektin FimH als Modellsystem ausgewählt, welches die Mannose-spezifische Adhäsion der Bakterien maßgeblich steuert. Die Aufklärung und Kontrolle dieses Adhäsionsprozesses war in dieser Arbeit das übergeordnete Ziel. Drei verschiedene Strategien wurden für die Untersuchung der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem Lektin FimH und Mannosiden betrachtet, welche die spezifische Markierung der Bindungstasche in Lösung erlauben. Dem Ziel der Schaltung der FimH-Funktion für die Kontrolle bakterieller Adhäsion wurde sich in zwei unterschiedlichen Ansätzen genähert.



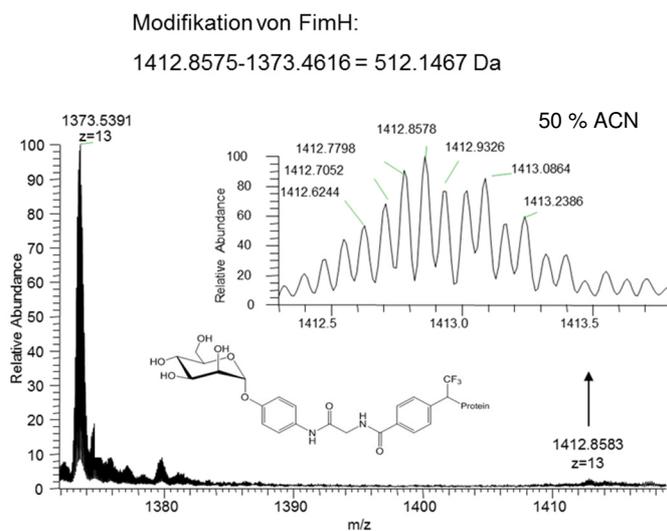
4.1 Design, Synthese und Anwendung photolabiler Mannosidliganden zur Markierung der Bindungstasche des bakteriellen Lektins FimH

Im ersten Teilprojekt wurde die Photoaffinitätsmarkierung für die selektive Markierung der FimH-Bindungstasche angewandt. Durch die Bestrahlung eines in der FimH-Bindungstasche komplexierten, hochaffinen photolabilen Mannosidliganden wird die photolabile Gruppe aktiviert und in ein hochreaktives Intermediat umgesetzt. Im Fall der Diazirine ist dieses ein Carben, welches in einer Insertionsreaktion idealerweise mit der Proteinoberfläche reagiert und so den Liganden nach der Bestrahlung kovalent in Nähe der Bindungstasche bindet. Vier verschiedene photolabile Mannosidliganden wurden entworfen und ihre Affinität zur FimH-Bindungstasche in Computergestützten Docking-Studien evaluiert. Von den vier Liganden zeigten nur **4**, **5** und **6** eine hohe Bindungsstärke, so dass lediglich diese für die Synthese ausgewählt wurden. Unter allen Liganden zeigte der einfachste Ligand **4** die höchste Affinität zur FimH-Bindungstasche und ein großes Markierungspotential. Ausgehend von dem in einer neunstufigen Synthese dargestellten Diazirin-Photophor **18** konnte Ligand **4** in hoher Reinheit und Diazirin **5** mit minimaler Verunreinigung erhalten und für Markierungsversuche von FimH verwendet werden. Die Isolierung des nach der Reaktion massenspektrometrisch nachgewiesenen Liganden **6** war nicht möglich.



Die ersten Reaktionsansätze des Diazirins **4** mit FimH_{tr} bzw. mit diversen Peptiden unter Zusatz von Methanol zur besseren Löslichkeit des Liganden waren nicht erfolgreich. Das Lösungsmittel war in allen Fällen der favorisierte Reaktionspartner des Carbens. Es zeigte sich, dass die Auswahl des organischen Lösungsmittel, welches der Pufferlösung zugesetzt wird, ein mit entscheidender Faktor ist. So wurde mit dem photolabilen Liganden **5** erstmals ein Insertionsprodukt mit 4-Hydroxybenzylalkohol unter Verwendung von 50 % Acetonitril oder

DMSO erhalten. Mit einem 70-fachen Überschuss des photolabilen Liganden **4** wurden für die Markierung des FimH_{tr} unter Verwendung von 50 % Acetonitril bzw. 10 % DMSO die ersten



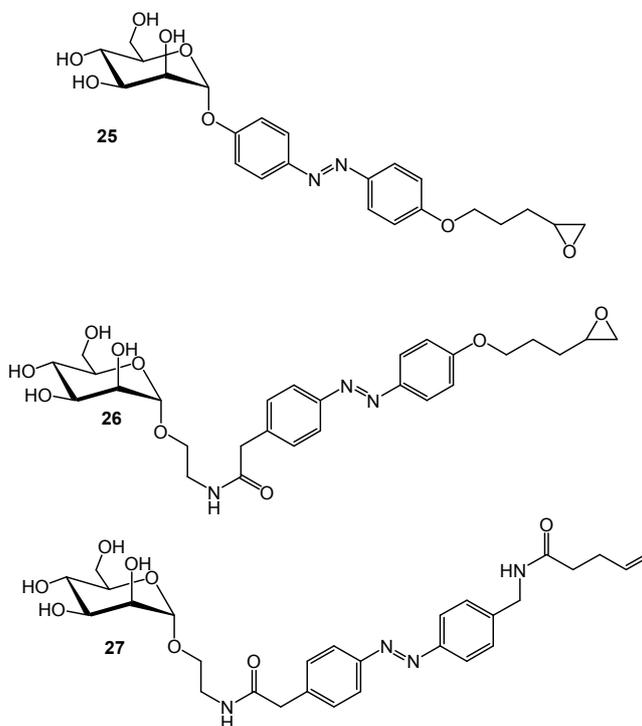
positiven Ergebnisse erzielt. Das einfach markierte FimH_{tr}-Produkt konnte im ESI-MS in geringer Ausbeute von maximal 1.55 % nachgewiesen werden. Nach enzymatischer Hydrolyse und anschließender MS/MS-Analyse konnte die markierte Aminosäure aus den Peptidfragmenten mit den gewählten Methoden bisher jedoch nicht identifiziert werden.

Obwohl die Photoaffinitätsmethode für die Markierung von Lektinen in der Nähe der Bindungstasche sehr spezifisch ist, werden aufgrund der hohen Reaktivität des Carbens und lösungsmittelbedingter Nebenreaktionen meist geringe Ausbeuten für die Insertionsreaktion am Protein erhalten. Im Vergleich mit den von MÄRTEN^[60] synthetisierten photolabilen Liganden wurden als Ziele dieses Teilprojektes eine durch ein sorgfältiges Design der Liganden verursachte Erhöhung der Affinität zur FimH-Bindungstasche und eine gesteigerte Ausbeute der Markierungsreaktion angestrebt. Die höhere Affinität der Liganden ging jedoch mit einer schlechteren Wasserlöslichkeit einher, so dass keine Verbesserung erzielt werden konnte. Eine gute Löslichkeit der photolabilen Mannoside sollte daher mehr im Vordergrund stehen. In Anbetracht der Schwierigkeiten der Photoaffinitätsmethode und der aufwendigen Synthese der photolabilen Liganden, stellt die Neuentwicklung des Projektes unter der Verwendung chemischer Methoden für die Markierung von Proteinen die erfolgsversprechende Alternative für die Fortführung dieses ersten Teilprojektes dar.

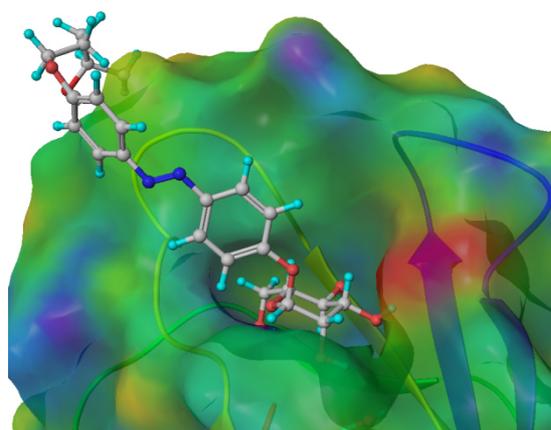
4.2 Design und Synthese photoschaltbarer Liganden für das bakterielle Lektin FimH

Im zweiten Teilprojekt wurden Epoxid-funktionalisierte Mannosidliganden für die affinitätsgesteuerte Markierung der FimH-Bindungstasche dargestellt. Mit der Verwendung von Epoxiden als reaktive Gruppe wurde eine Vereinfachung in der Anwendung und Synthese der Liganden sowie eine Steigerung der Markierungsausbeute erwartet.^[46] Neben der

Markierung der FimH-Bindungstasche stand mit diesem Teilprojekt ebenfalls das Forschungsziel der photochemischen Schaltung der Funktion des Lektins im Vordergrund. Die entworfenen Epoxid-funktionalisierten Liganden weisen eine durch photochemische *cis/trans*-Isomerisierung steuerbare Azobenzolfunktion aus, welche nach der Markierungsreaktion eine gezielte Aktivierung bzw. Inaktivierung der Proteinfunktion bewirken kann. Das Potential der Methode und der konzipierten Liganden wurde zusätzlich



durch theoretische Untersuchungen evaluiert und optimiert. Für die Realisierung dieses Projektes wurden drei verschiedene photoschaltbare FimH-Liganden entworfen, wobei Ligand **25** und **26** mit einer Epoxidfunktion ausgestattet für die kovalente Markierung des Lektins



verwendet werden können. Ligand **27** wurde als Referenzligand benötigt. Die drei Liganden wurden in Docking-Studien nach ihrer Affinität zur FimH-Bindungstasche und ihrem Potential für die Markierung analysiert. Anhand der Docking-Ergebnisse wurde der Liganden **25** in einer vierstufigen Synthese über ein Diazoniumsalz synthetisiert und das Mannosid **27** über die

Zwischenstufe eines orthogonal geschützten Azobenzols **43** dargestellt.

Mit der Synthese der Liganden **25** und **27** wurde in dieser Arbeit der Grundstein für die zukünftige Testung des konzipierten Systems gelegt, welcher neben der Markierung der FimH-

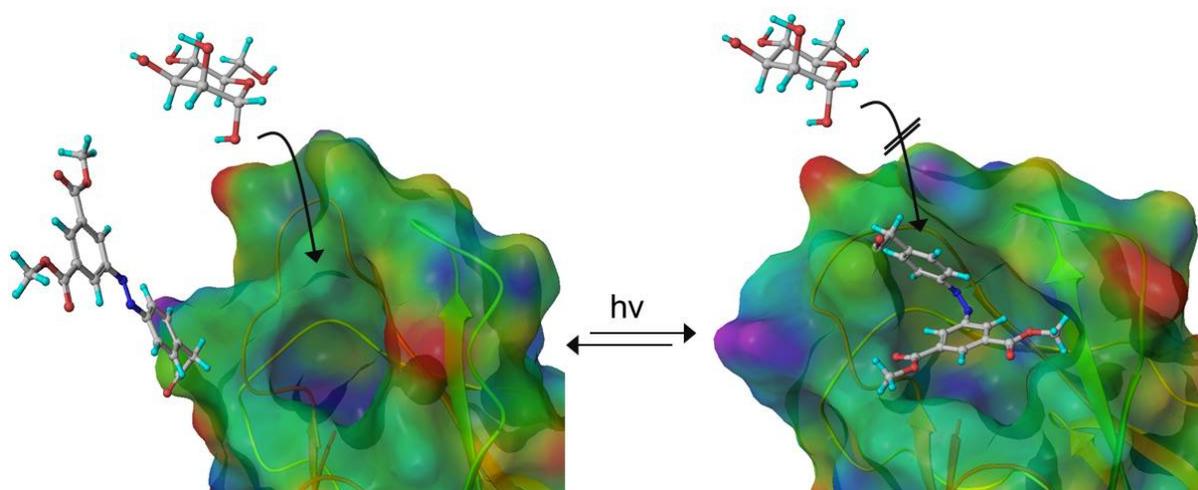
Bindungstasche ebenfalls die Option zur Schaltung der Proteinfunktion beinhaltet. Neben der Testung der Markierungsreaktion mit FimH, muss eine ausführliche Analyse der photochemischen Eigenschaften der Liganden erfolgen. Eine lange Halbwertszeit sowie eine gute Schalteffizienz sind für den Erfolg des Konzeptes der schaltbaren FimH-Funktion mit entscheidend. Nach erfolgreicher Markierung der FimH-Bindungstasche kann der Schaltprozess wie auch der Einfluss auf die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Proteinfunktion am markierten Lektin direkt untersucht werden.

Die Betrachtung der dynamischen Ligand-Protein Wechselwirkungen könnte beispielsweise mit Hilfe von STD- (engl.: *saturation-transfer difference*-) NMR Experimenten geschehen, welche die Betrachtung der dynamischen Ligand-Protein-Wechselwirkungen erlauben.^[112] Da die Schaltung in Lösung auch direkt im NMR-Röhrchen möglich ist, erscheint diese Methode sehr vielversprechend.

4.3 Verwendung einer DMAP-vermittelten Ligationsstrategie zur Modifizierung des bakteriellen Lektins FimH

Im wichtigsten Teilprojekt dieser Arbeit wurde die DMAP-gesteuerte Ligationsmethode nach HAMACHI *et al.*^[51] für die Modifizierung der FimH-Bindungstasche verwendet. Mit der Fixierung eines Azobenzolderivats als eine Art *gate keeper*-Molekül am Eingang der Bindungstasche wird die photochemische Kontrolle des Zugangs zur Bindungstasche erzielt. Dem Konzept nach ist der Eingang zur Bindungstasche offen, wenn die Azobenzoleinheit in *trans*-Konfiguration vorliegt, während er durch Schaltung in die *cis*-Konfiguration sterisch blockiert wird. Ein DMAP-Derivat katalysiert die Modifizierungsreaktion unter Ausbildung eines Aktivesters mit dem in der Form eines Thioesters vorliegenden Azobenzolderivats. Dieser Aktivester wird durch ein Nukleophil der Proteinoberfläche gespalten, woraufhin das Azobenzolderivat kovalent an das Protein gebunden ist. Für die Realisierung dieses Projektes wurde die Synthese zweier unterschiedlicher DMAP-Mannoside **50** und **51** sowie die Darstellung von vier Azobenzolthioestern **52-55** geplant. Die Liganden **50** und **51** wurden durch Docking-Studien auf ihre Affinität zur FimH-Bindungstasche untersucht, erfolgreich synthetisiert und in einem GFP-Assay mit *E. coli*-Bakterien getestet. Die Azobenzolthioester **52**, **53** und **54** wurden erfolgreich dargestellt und das Potential der einzelnen Azobenzolderivate **52-55** in theoretischen Studien ausgiebig untersucht. Dabei stellte sich eine Substitution am äußeren Benzolring der Azobenzoleinheit, wie sie bei **53-55** vorliegt, als vorteilhaft für den

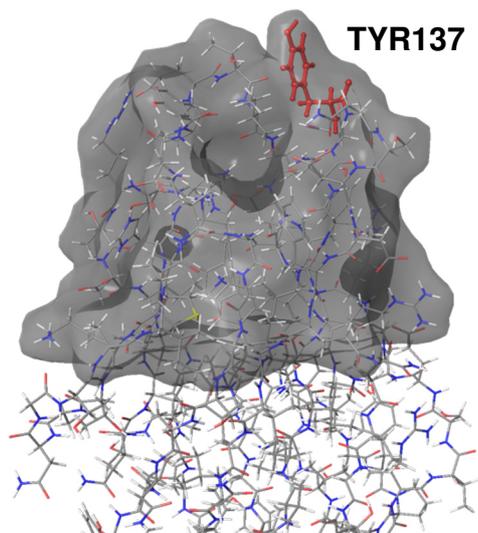
effizienteren Verschluss der FimH-Bindungstasche heraus. Insgesamt waren die Ergebnisse aller Strukturen aber zu wenig zielgerichtet, so dass deren Struktur nicht immer in Richtung der Bindungstasche zeigte. Nach der ersten erfolgreichen Markierung mit dem Modellsystem 4-Hydroxybenzylalkohol gelang ebenfalls die Modifizierung von Tyrosin und drei verschiedener Peptide. Durch MS/MS-Sequenzierung konnten bei den Peptiden Modifikationen am *N*-Terminus, an Lysin und Tyrosin sicher nachgewiesen werden. Zur Optimierung der Markierungsreaktion wurde neben der Erhöhung der Reaktionszeit von drei auf zwölf Stunden zusätzlich Acetonitril bzw. DMSO dem Puffersystem zugefügt zur Verbesserung der



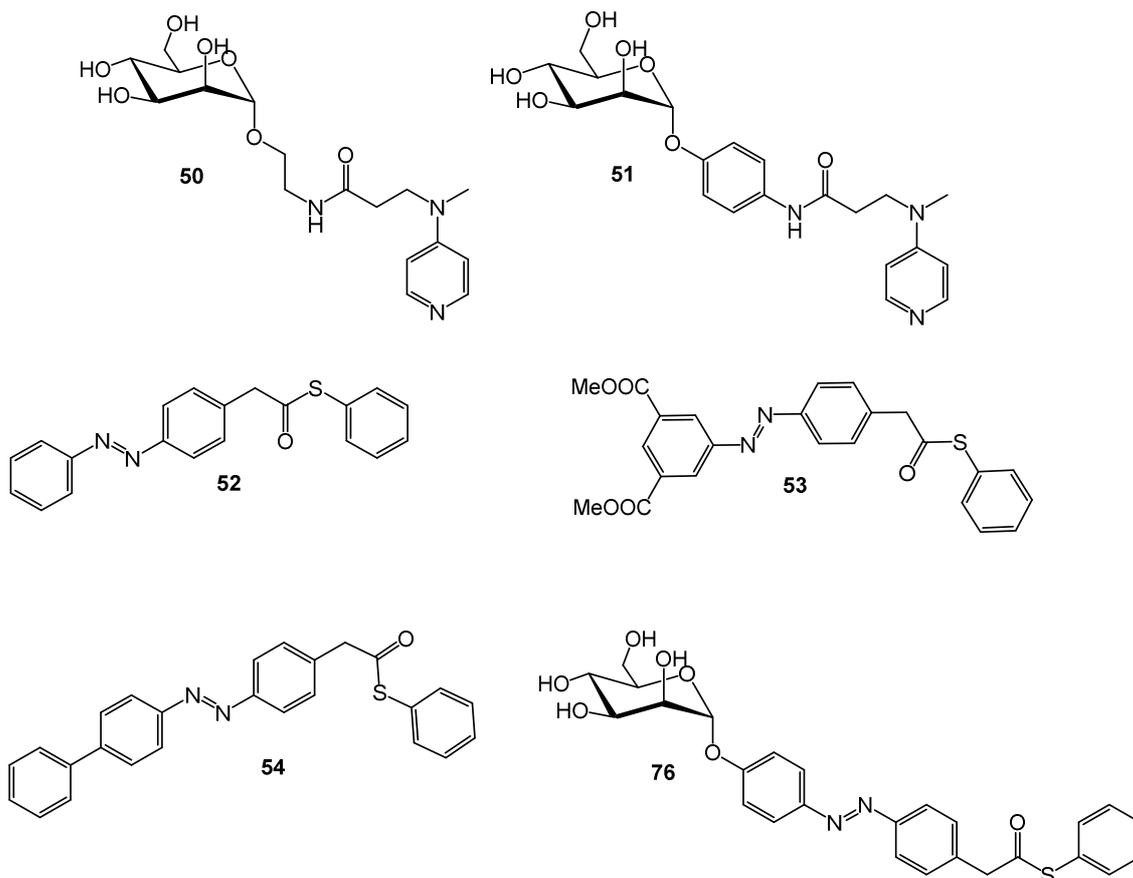
Löslichkeit des verwendeten Thioesters **52**. Die Markierungsreaktion wurde in einem supramolekularen System auf Polystyrol- und später auch auf Goldoberflächen getestet. Nach Testung an einer an die Struktur von Tyrosin angelehnten phenolischen Oberfläche wurde FimH unter den zuvor optimierten Reaktionsbedingungen eingesetzt. Erstmals konnten mehrere Modifikationen an einem FimH gefunden werden, unter denen auch eine Modifikation von TYR137 an der Bindungstasche identifiziert wurde.

Die Modifikation gelang ebenfalls mit den Thioestern **53**, **54**, **76**. In einem finalen Experiment mit allen verwendeten Thioestern konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Spezifität eindeutig bewiesen werden. Alle Modifikationsreaktionen der Thioester **52**, **53** und **76** konnten am TYR137 identifiziert werden. Mit Hilfe der DMAP-Ligationschemie ist damit erstmals eine spezifische Markierung der FimH-Bindungstasche in Lösung gelungen.

Für eine weitere Optimierung der DMAP-gesteuerten Ligationschemie am FimH gilt es, die Ausbeute der FimH-Modifizierung z. B. durch die Variation der Reaktionszeit und -temperatur, des Lösungsmittels sowie der Äquivalente der DMAP-Liganden und Thioester zu steigern. Zusätzlich ist die Wahl eines gut wasserlöslichen Thioesters zu bevorzugen. Für die effektivere Schaltung der Proteinfunktion erscheint ein



Thioester mit Affinitätssubstituenten wie er von STAMER^[110] synthetisiert wurde sinnvoll zu sein, allerdings wäre es vorteilhaft diesen in Bezug auf die Löslichkeit in einem wässrigen System weiter zu modifizieren. Zudem könnte eine Mannoseeinheit eventuell ein zu starker Bindungspartner sein, so dass die Rückisomerisierung des Azobenzolderivats erschwert ist,



sobald der Ligand in *cis*-Konfiguration in der Bindungstasche komplexiert ist. Ein schwächerer, aber dennoch bindender Ligand wie α -D-Glucose könnte eine wertvolle Alternative darstellen.

Sobald die Ausbeute der Modifikation gesteigert ist, können die photoschaltbaren Eigenschaften der Azobenzolderivate wie schon zuvor beschrieben (Kapitel 4.2) vor und nach der Bindung an das FimH getestet werden. Die Effektivität der Schaltung der Proteinfunktion kann letztendlich im NMR-Spektrometer mit Hilfe von STD-Experimenten untersucht werden, wodurch der dynamische Bindungsprozess in Lösung betrachtet werden kann.

Mit der DMAP-vermittelten Ligationsstrategie wurde in dieser Arbeit eine wertvolle Methode zur Modifizierung von FimH an der Bindungstasche etabliert, welche die Untersuchung der Lektinfunktion des FimH im Detail und dessen photochemische Kontrolle durch gezielte Modifikation ermöglicht. Verschiedene Azobenzolderivate wurden getestet, die sich allerdings vor allem in ihrer Ausrichtung als noch nicht zielgerichtet genug zum Eingang der CRD zeigten, dennoch wurde mit dieser Arbeit ein bedeutender Schritt für das Ziel der Kontrolle bakterieller Adhäsion durch die molekulare Modifikation des Adhäsins FimH erbracht.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Methoden

Alle luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden unter Stickstoffatmosphäre und alle Reaktionen mit photolabilen Komponenten unter Lichtausschluss durchgeführt. Ionenaustauscher wurden vor der Verwendung mit Methanol gewaschen, alle anderen kommerziell erhältlichen Reagenzien wurden, sofern nicht anders erwähnt, ohne weitere Reinigungsvorgänge eingesetzt.

Es wurden ausschließlich vordestillierte bzw. absolutierte Lösungsmittel eingesetzt:

Dichlormethan	über Calciumhydrid
Methanol	über Magnesiumspäne
Diethylether	über Natrium
DMF	getrocknet vom Hersteller (Fluka)

Chromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (200-400 mesh, Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma Merck eingesetzt. Die Chromatographie wurde mit leichtem Überdruck durchgeführt.

Dünnschichtchromatogramme wurden auf DC-Aluminiumfolien (Kieselgel 60, F₂₅₄) der Fa. Merck angefertigt. Die Visualisierung der Substanzen erfolgte in Abhängigkeit der Verbindung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$ und $\lambda = 366 \text{ nm}$) oder durch verschiedene Anfärbereagenzien:

Schwefelsäure-Reagenz:	10 % ige Lösung in Ethanol
Ninhydrin-Reagenz:	300 mg Ninhydrin in 100 mL Butanol und 3 mL Eisessig
Molybdophosphorsäure-Reagenz:	10 % ig in Ethanol

Verwendete Geräte für die Analytik

NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten der Firma Bruker gemessen:

- AC-200 mit Messfrequenzen von 200.13 MHz für ^1H -, 75.47 MHz für ^{13}C - und 188.31 MHz für ^{19}F -Kerne.
- DRX-500 mit Messfrequenzen von 500.13 MHz für ^1H -, 125.47 MHz für ^{13}C - und 470.59 MHz für ^{19}F -Kerne.
- AV-600 mit Messfrequenzen von 600.13 MHz für ^1H - und 150.91 MHz für ^{13}C -Kerne.

Die Zuordnung der Signale wurde durch ein- und zweidimensionale Methoden (DEPT, COSY, HSQC und HMBC) vorgenommen. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte mit Hilfe folgender Signale:

CDCl_3	^1H : 0.00 ppm (s) (zugesetztes TMS) ^{13}C : 77.00 ppm (t)
MeOH-d_4	^1H : 3.31 ppm (quint) ^{13}C : 49.05 ppm (sept)
DMSO-d_6	^1H : 2.50 ppm (quint) ^{13}C : 39.5 ppm (sept)
D_2O	^1H : 4.65 ppm (s)

Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm und die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz) angegeben. Zur Beschreibung der einzelnen Signale wurden folgende Bezeichnungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett, m_c = zentriertes Multiplett, br = breites Signal.

Massenspektren

MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Biflex III-Gerät der Firma Bruker-Daltonics aufgenommen. Als Matrix diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in Acetonitril/Wasser 1:1. Die Probenpräparation auf dem Target erfolgte nach dem Schichtverfahren, die Ionisierung der Moleküle mit einem Stickstofflaser bei 337 nm.

ESI-Massenspektren wurden mit einem Mariner ESI-TOF 5280 der Firma Applied Biosystems sowie mit einem LCQ Classic von Thermofinnigan aufgenommen.

HRESI-Massenspektren wurden in der Arbeitsgruppe von A. THOLEY mit einem Thermo Scientific Exactive™ Plus Orbitrap Massenspektrometer unter Verwendung einer beheizbaren Electrospray Ionenquelle mit einer Spannung von 4.4 kV aufgenommen.

EI/CI-Massenspektren wurden an einem AccuTOF 4GCV von Jeol bzw. an einem MAT 8230 der Firma Finnigan gemessen.

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 $[\text{ml} \cdot (\text{mg} \cdot \text{dm})^{-1}]$ und die Konzentrationen c in $[\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}]$ angegeben.

Schmelzpunkte

Schmelzpunkte wurden mit einer Electrothermal Schmelzpunktapparatur gemessen.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer Paragon 1000 der Firma Perkin Elmer unter Verwendung einer Golden-Gate-Diamond_ATR-Einheit A531-G gemessen. Die Abkürzungen w, m und s kennzeichnen die Signalintensität schwach, mittel und stark. Die Abkürzung br. beschreibt ein sehr breites Signal.

UV-Lampen

Bestrahlungsexperimente wurden mit Hilfe einer Mitteldruck-Quecksilberdampfampe (TQ-150) (150 Watt) durchgeführt.

UV-Vis-Spektren

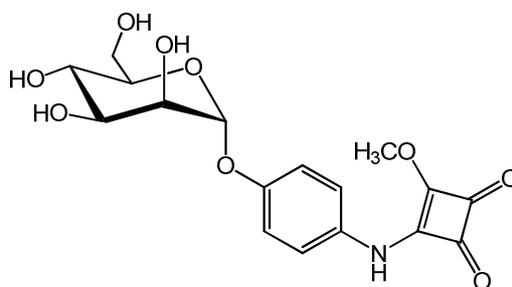
UV-Vis-Spektren wurden mit einem UV-Vis-Spektrometer Lambda 14 der Firma Perkin-Elmer und einer Temperiereinheit (25.0 ± 0.1 °C) der Firma Büchi aufgenommen. Die Messungen wurden in Quarzglas-Küvetten ($\varnothing = 1$ cm) durchgeführt.

5.2 Durchgeführte Synthesen

AAV 1: Reduktion von 4-Nitrophenyllessigsäure-*tert*-butylester (41) zur Nitrosoverbindung 42

Die Nitroverbindung (5.56 mmol) wurde in Ethanol (70 mL) gelöst und mit einer wässr. Ammoniumchloridlösung (8.52 mmol in 19 mL dest. Wasser) versetzt. Die Lösung wurde durch 30 minütige Einleitung von Stickstoff entgast, woraufhin Zinkpulver (15.6 mmol) langsam zugegeben werden konnte. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei Raumtemp. gerührt, filtriert und langsam zu einer Lösung aus Eisenchlorid-Hexahydrat (10.7 mmol) in einer Wasser/Ethanol-Mischung (120 mL) bei -10 °C gegeben. Nach 1 h wurde die Kühlung entfernt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde dreimal mit Ethylacetat (je 100 mL) extrahiert und die org. Extrakte über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde per MALDI-MS (Matrix: DHB) identifiziert und anschließend ohne weitere Charakterisierung in der nächsten Stufe weiter umgesetzt.

N-[*p*-(α -D-Mannopyranosyloxy)phenyl]amido-quadratsäuremethylester (3)^[75]



Zu einer Lösung des 4-Aminophenyl- α -D-mannopyranosids (**19**, 200 mg, 737 μ mol) in abs. Methanol (15 mL) wurde der Quadratsäurediester **21** (314 mg, 2.21 mmol) zugesetzt und die Reaktionsmischung anschließend 16 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Ethylacetat, Methanol, 3:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 166 mg (436 μ mol, 59 %, C₁₇H₁₉NO₉, M = 381.33 g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 2:1): R_f = 0.43;

Smp.: 198 °C (Zers.);

Drehwert: $[\alpha]_D = +88.0$ (T = 21 °C, c = 0.4, DMSO);

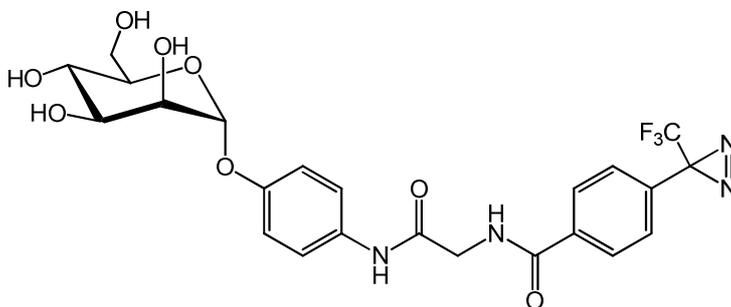
¹H-NMR (200 MHz, MeOH-d₄, 300 K): $\delta = 7.30$ (d, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, CH_{arom-2,6}), 7.12 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, CH_{arom-3,5}), 5.45 (d, $^3J_{1,2} = 1.8$ Hz, 1H, H-1), 4.44 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (dd, $^3J_{2,1} = 1.8$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.4$ Hz, 1H, H-2), 3.89 (dd, $^3J_{3,2} = 3.4$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.4$ Hz, 1H, H-3), 3.80 (dd, $^3J_{6',5} = 2.8$ Hz, $^2J_{6',6} = 11.9$ Hz, 1H, H-6'), 3.73 (dd~t, $^3J_{4,3} = ^3J_{4,5} = 9.4$ Hz, 1H, H-4), 3.71 (dd, $^3J_{6,5} = 4.6$ Hz, $^2J_{6,6'} = 11.9$ Hz, 1H, H-6), 3.60 (ddd, $^3J_{5,6'} = 2.8$ Hz, $^3J_{5,6} = 4.6$ Hz, $^3J_{5,4} = 9.4$ Hz, 1H, H-5) ppm;

¹³C-NMR (151 MHz, MeOH-d₄, 300 K): $\delta = 193.9, 193.6$ (2C, C=O_{Quadratsäure}), 179.8, 164.9 (2C, C_{Quadratsäure}), 154.4 (1C, C_{arom}), 132.8 (1C, C_{arom}), 122.6 (2C, CH_{arom}), 118.5 (2C, CH_{arom}), 100.5 (1C, C-1), 75.5 (1C, C-5), 72.4 (1C, C-3), 72.0 (1C, C-2), 68.4 (1C, C-4), 62.7 (1C, C-6), 59.8 (1C, OCH₃) ppm;

MALDI-MS: $m/z = 404.46$ [M+Na]⁺;

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3260$ (m), 1797 (w), 1698 (m), 1624 (m), 1586 (s), 1396 (s), 1234 (s), 1004 (s), 811 (m) cm⁻¹.

***N*^α-(4'-Trifluormethyldiazirin)-phenylamid-glycin-[4-(α -D-mannopyranosyl-oxy)]-phenylamid (4)**



N^α-Boc-glycin-[*p*-(α -D-mannopyranosyloxy)]phenylamid (**20**, 52.8 mg, 160 μ mol) wurde zusammen mit 3-{*p*-(Carboxy)phenyl}-3-trifluormethyldiazirin (**18**, 27.6 mg, 120 μ mol) und HATU (83.7 mg, 220 μ mol) für 1 h i. Vak. evakuiert. Anschließend wurden die Feststoffe in abs. DMF (5 mL) gelöst und mit DIPEA (20.0 μ L, 140 μ mol) versetzt. Es wurde 14 h bei

Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat, Methanol, 5:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 17.2 mg (30.0 μ mol, 19 %, $C_{23}H_{23}F_3N_4O_8$, $M = 540.45$ g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 2:1): $R_f = 0.76$;

1H -NMR (500 MHz, MeOH- d_4 , 300 K): $\delta = 7.99$ (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-2',6'}}$), 7.48 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-2,6}}$), 7.36 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-3',5'}}$), 7.08 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-3,5}}$), 5.43 (d, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, 1H, $\underline{H-1}$), 4.18 (s, 2H, $\underline{CH_2}$ -Glycin), 3.99 (dd, $^3J_{1,2} = 1.7$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.4$ Hz, 1H, $\underline{H-2}$), 3.89 (dd, $^3J_{3,2} = 3.4$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.4$ Hz, 1H, $\underline{H-3}$), 3.76 (dd, $^3J_{6,5} = 2.5$ Hz, $^2J_{6,6'} = 11.9$ Hz, 1H, $\underline{H-6}$), 3.73 (mc, 1H, $\underline{H-4}$), 3.71 (dd, $^3J_{6',5} = 5.1$ Hz, $^2J_{6',6} = 11.9$ Hz, 1H, $\underline{H-6'}$), 3.61 (ddd, $^3J_{5,6} = 2.5$ Hz, $^3J_{5,6'} = 5.1$ Hz, $^3J_{5,4} = 9.8$ Hz, 1H, $\underline{H-5}$) ppm;

^{13}C -NMR (126 MHz, MeOH- d_4 , 300 K): $\delta = 171.6$ (1C, $\underline{CN_2}$), 169.5 (1C, $\underline{C=O}$), 169.2 (1C, $\underline{C=O}$), 154.7 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-4}}$), 136.7 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-1'}}$), 134.1 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-1}}$), 133.3 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-4'}}$), 129.3 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-2',6'}}$), 127.7 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-3',5'}}$), 122.9 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-2,6}}$), 121.3 (1C, q, $J = 274.9$ Hz, $\underline{CF_3}$), 118.2 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-3,5}}$), 100.6 (1C, $\underline{C-1}$), 75.4 (1C, $\underline{C-5}$), 72.4 (1C, $\underline{C-3}$), 72.0 (1C, $\underline{C-2}$), 68.4 (1C, $\underline{C-4}$), 62.7 (1C, $\underline{C-6}$), 44.4 (1C, $\underline{CH_2}$ -Glycin) ppm;

^{19}F -NMR (471 MHz, MeOH- d_4 , 300 K): $\delta = -66.87$ (s) ppm;

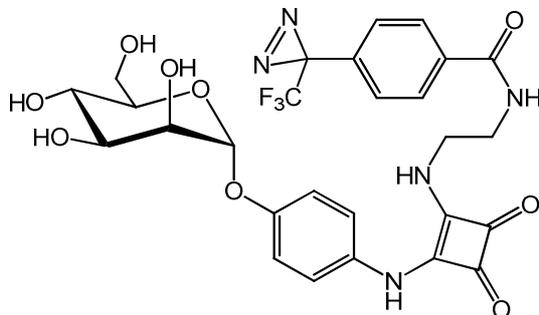
ESI-MS: $m/z = 579.12$ $[M+K]^+$, 563.14 $[M+Na]^+$, 535.13 $[(M+Na)-N_2]^+$;

HRESI-MS: $m/z = 541.15424$ $[M+H]^+$ ($M = 541.15408$, ber. für $C_{23}H_{23}F_3N_4O_8$);

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 345$ nm;

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3317$ (m), 2927 (w), 2503 (w), 2093 (w), 1671 (m), 1637 (m), 1550 (s), 1511 (s), 1224 (s), 1015 (m), 940 (m), 681 (m) cm^{-1} .

{N-[4-(α -D-Mannopyranosyloxy)phenyl]-N'-2'-(4''-trifluormethyldiazirinphenyl-amido)-ethyl}quadratsäurediamid (5**)**



{N-[4-(α -D-Mannopyranosyloxy)phenyl]-N'-(2'-*tert*-butyloxycarbonylamidoethyl)}quadratsäurediamid (**22**, 152 mg, 290 μ mol) wurde in dest. Wasser (6 mL) und TFA (3 mL) gelöst. Es wurde 3 h bei Raumtemp. gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, mit Toluol kdestilliert und mit basischem Ionenaustauscher in Methanol neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das freie Amin wurde zusammen mit 3-{*p*-(Carboxy)phenyl}-3-trifluormethyldiazirin (**18**, 56.0 mg, 250 μ mol) und HATU (114 mg, 300 μ mol) für 30 min i. Vak. getrocknet. Anschließend wurden die Substanzen in abs. DMF (10 mL) gelöst und DIPEA (20.0 μ L, 180 μ mol) hinzugegeben. Es wurde 16 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan, Methanol, 8:1 \rightarrow 4:1). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten, der noch Verunreinigungen zeigte, die nicht abgetrennt werden konnten.

Ausbeute: 123 mg Produktgemisch (C₂₇H₂₆F₃N₅O₉, M = 621.52 g/mol);

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 7.96-7.92 (m, 2H, CH_{arom-2',6'}), 7.39 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, CH_{arom-2,6}), 7.35 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, CH_{arom-3',5'}), 7.14-7.10 (m, 2H, CH_{arom-3,5}), 5.47 (d, ³J_{1,2} = 1.8 Hz, 1H, H-1), 4.04 (dd, ³J_{2,1} = 1.8 Hz, ³J_{2,3} = 3.4 Hz, 1H, H-2), 3.93 (dd, ³J_{3,2} = 3.4 Hz, ³J_{3,4} = 9.4 Hz, H-3), 3.80 (dd, ³J_{6,5} = 2.6 Hz, ²J_{6,6'} = 12.0 Hz, 1H, H-6), 3.78-3.73 (m, 2H, H-4, H-6'), 3.70-3.66 (m, 2H, CH_{2-Ethyl-1}) 3.64 (ddd, ³J_{5,4} = 9.8 Hz, ³J_{5,6'} = 4.5 Hz, ³J_{5,6} = 2.6 Hz, 1H, H-5), 3.29-3.23 (m, 2H, CH_{2-Ethyl-2}) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 169.3, 165.6 (2C, C_{Quadratsäure}), 154.6 (1C, C_{arom-4}), 137.0 (1C, C_{arom-1''}), 134.6 (1C, C_{arom-1}), 133.2 (1C, C_{arom-4'}), 129.1 (2C, CH_{arom-2''',6''}), 127.7 (2C, CH_{arom-3''',5''}), 121.5 (2C, CH_{arom-2,6}), 118.7 (2C, CH_{arom-3,5}), 100.6 (1C, C-1),

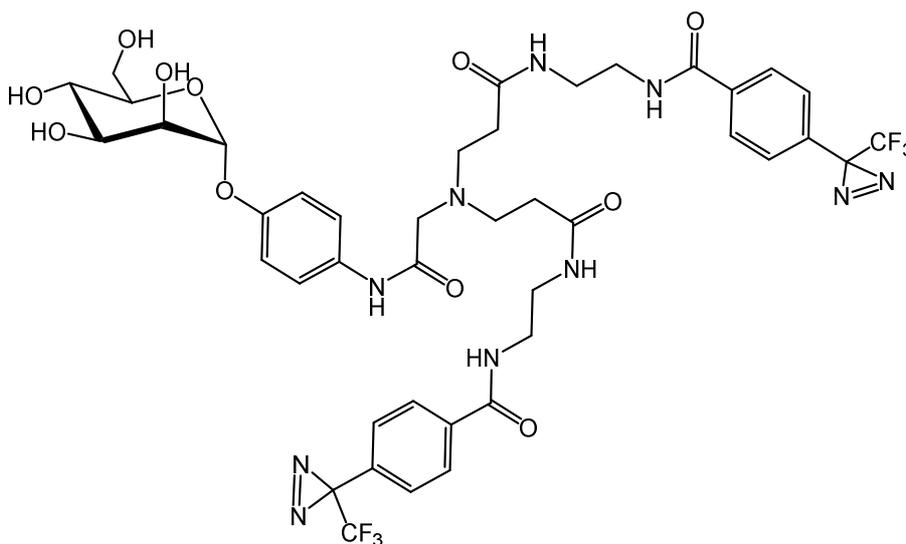
75.4 (1C, C-5), 72.4 (1C, C-3), 72.0 (1C, C-2), 60.3 (1C, C-4), 62.6 (1C, C-6), 43.8 (1C, CH₂-1), 42.1 (1C, CH₂-2) ppm;

Fehlende Signale im ¹³C-NMR aufgrund zu niedriger Intensität: 2C(Quadratsäure, 2 C=O), 1C (CF₃).

¹⁹F-NMR (471 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = -66.84 (s) ppm;

MALDI-MS: *m/z* = 620.72 [M]⁺.

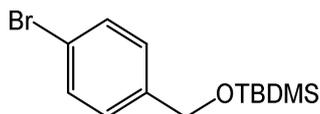
***N*^α,*N*^α-Bis-(*N*-(2-(*N*-(4''-trifluormethyldiazirinphenylamido)-ethyl-propylamido)-glycyl-4'-(α-D-mannopyranosyloxy)-phenylamid (6)**



N^α,*N*^α-Bis-(propansäure(2-(*N*-*boc*-amino)ethylamid)glycin-4'-(α-D-mannopyranosyloxy)phenylamid (**24**, 40.0 mg, 53.0 μmol) wurde in 40 % iger Trifluoressigsäure-Lösung bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wurde anschließend lyophilisiert. Der Rückstand wurde zusammen mit HATU (50.2 mg, 132 μmol) und 3-{*p*-(Carboxy)phenyl}-3-trifluormethyldiazirin (**18**, 30.4 mg, 132 μmol) für 1 h i.Vak. getrocknet. Anschließend wurden die Feststoffe in abs. DMF (4 mL) gelöst und mit DIPEA (20.0 μL, 132 μmol) versetzt. Es wurde 12 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Dichlormethan, Methanol, 5:1) gereinigt. Eine vollständige Isolierung des Produktes war jedoch nicht möglich.

MALDI-MS: $m/z = 980.0$ $[M]^+$ ($M = 980.3$, ber. für $C_{42}H_{46}F_6N_{10}O_{11}$).

(*tert*-Butyl-dimethyl-silyl)oxymethyl-4-brombenzol (9)



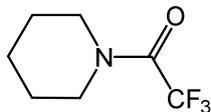
p-Brombenzylalkohol (**8**, 3.00 g, 16.0 mmol) wurde in abs. DMF (20 mL) gelöst und mit Imidazol (2.70 g, 40.0 mmol) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (2.70 g, 18.0 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei Raumtemp. gerührt (DC-Kontrolle, Essigester, Toluol, 1:1) und anschließend dreimal mit *n*-Hexan (je 20 mL) extrahiert. Die Phasen wurden getrennt und die Hexan-Phase zweimal mit dest. Wasser (je 30 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Produkt wurde ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 4.60 g (15.0 mmol, 95 %, $C_{13}H_{21}BrOSi$, $M = 301.29$ g/mol) (Lit.^[72]: 97 %);

DC (Essigester, Toluol, 1:1): $R_f = 0.7$;

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 7.36$ (d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, $\underline{CH}_{\text{arom-3,5}}$), 7.00 (d, 2H, $^3J = 8.4$ Hz, $\underline{CH}_{\text{arom-2,6}}$), 4.59 (s, 2H, \underline{CH}_2), 0.84 (s, 9H, $C(\underline{CH}_3)_3$), 0.00 (s, 6H, $Si(\underline{CH}_3)_2$) ppm;

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 140.5$ (1C, $\underline{C}_{\text{arom}}$), 131.3 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom}}$), 127.7 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom}}$), 120.6 (1C, $\underline{C}_{\text{arom}}$), 64.3 (1C, \underline{CH}_2), 25.9 (3C, $C(\underline{CH}_3)_3$), 18.4 (1C, $\underline{C}(\underline{CH}_3)_3$), - 5.0 (2C, $Si(\underline{CH}_3)_2$) ppm.

***N*-Trifluoracetylpiperidin (11)**

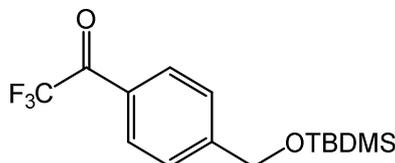
Eine Lösung von Triethylamin (28.8 mL, 208 mmol) in abs. Diethylether (70 mL) wurde mit Piperidin (**10**, 20.4 mL, 208 mmol) versetzt. Anschließend wurde innerhalb von 2.5 h unter Eiskühlung Trifluoressigsäureanhydrid (43.7 mL, 208 mmol) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurde dreimal mit 0.1 M Salzsäure (je 15 mL) und einmal mit dest. Wasser (100 mL) gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die org. Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgte über fraktionelle Vakuumdestillation. Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 38.3 g (211 mmol, quant., C₇H₁₀F₃NO, M = 181.16 g/mol) (Lit.^[113]: 95 %);

Sdp.: 80 °C (0.25 mbar);

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 3.57-3.40 (m, 4H, N(CH₂)₂), 1.68-1.51 (m, 6H, N(CH₂CH₂)₂, NCH₂CH₂CH₂) ppm;

¹⁹F-NMR (188 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = - 69.45 (s) ppm.

Trifluormethyl-*p*-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]phenylketon (12)

Zu einer auf 0 °C abgekühlten Lösung des geschützten Alkohols **9** (2.51 g, 14.7 mmol) in abs. Diethylether (50 mL) wurde eine 2.5 M *n*-BuLi-Lösung in Hexan (8.80 mL, 22.0 mmol) getropft. Diese Lösung wurde für 2 h bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von *N*-Trifluoracetylpiperidin (**11**, 3.46 g, 19.1 mmol) in abs. Diethylether (10 mL) zugetropft und die Reaktionsmischung für weitere 2 h bei dieser

Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Kühlung entfernt und die Lösung mit ges. wässr. Ammoniumchlorid-Lösung (20 mL) hydrolysiert. Die Phasen wurden getrennt und die org. Phase zweimal mit Ammoniumchlorid-Lösung (je 15 mL) und einmal mit dest. Wasser (20 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat, Cyclohexan, 1:1) gereinigt. Das Produkt wurde als leicht gelbliches Öl erhalten.

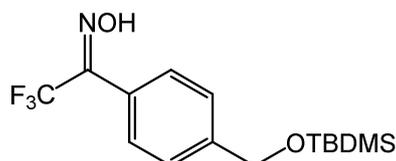
Ausbeute: 2.23 g (7.00 mmol, 48 %, C₁₅H₂₁F₃O₂Si, M = 318.41 g/mol) (Lit.^[72, 114]: 85 %);

DC (Ethylacetat, Cyclohexan, 1:1): *R_f* = 0.86;

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 7.94 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H, CH_{arom}-2,6), 7.38 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 2H, CH_{arom}-3,5), 4.71 (s, 2H, CH₂), 0.84 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂) ppm;

¹⁹F-NMR (188 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = - 71.86 (s) ppm.

Trifluormethyl-*p*-[-(*tert*-butyldimethylsilyl)oxymethyl]phenyloxim (**13**)



Eine Lösung von Trifluormethyl-*p*-[*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-hydroxymethyl]phenylketon (**12**, 2.15 g, 6.74 mmol) in Pyridin (50 mL) wurde mit Hydroxylamin-Hydrochlorid (1.39 g, 20.3 mmol) versetzt und 3 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde Pyridin i. Vak. entfernt und der Rückstand in Diethylether (50 mL) gelöst. Die org. Phase wurde einmal mit 0.01 M Salzsäure (30 mL) und dreimal mit dest. Wasser (je 15 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan, Methanol, 20:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

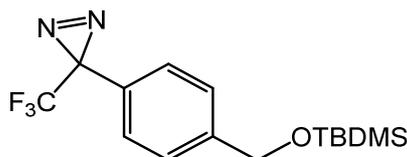
Ausbeute: 1.44 g (4.32 mmol, 64 %, C₁₅H₂₂F₃NO₂Si, M = 333.42 g/mol) (Lit.^[72]: 93 %);

DC (Dichlormethan, Methanol, 20:1): *R_f* = 0.6;

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = 7.40\text{--}7.38$ (m, 4H, $\text{CH}_{\text{arom-2,3,5,6}}$), 4.67 (s, 2H, CH_2), 0.84 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.00 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$) ppm;

$^{19}\text{F-NMR}$ (188 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = -67.11$ (s) ppm.

3-*p*-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxymethyl]phenyl]-3-trifluormethyl-diazirin (16)^[72]



Eine Lösung von Trifluormethyl-*p*-[*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-hydroxymethyl]phenyloxim (**13**, 1.20 g, 3.60 mmol) in abs. Dichlormethan (12 mL) wurde auf 0 °C abgekühlt und mit DMAP (22.0 mg, 180 μmol) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (824 mg, 4.32 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei Raumtemp. gerührt (DC-Kontrolle, Cyclohexan, Ethylacetat, 6:1). Nach beendeter Reaktion wurde der Rückstand mit dest. Wasser und Dichlormethan (80 mL) aufgenommen und die Phasen separiert. Die org. Phase wurde zweimal mit dest. Wasser (je 20 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

Das tosylierte Rohprodukt **14** wurde in abs. Dichlormethan gelöst und auf -78 °C abgekühlt. In diese Lösung wurde Ammoniak (ca. 20 mL) einkondensiert und das Gemisch über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde für 15 min Stickstoff in die Reaktionslösung eingeleitet, um überschüssigen Ammoniak auszutreiben. Der Rückstand wurde zwischen Wasser und Dichlormethan separiert. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Das Diaziridin-Rohprodukt **15** wurde in abs. Methanol (12 mL) gelöst, mit Triethylamin (1.40 mL, 10.1 mmol) versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Zu der abgekühlten Reaktionsmischung wurde eine 10 %ige Iod-Lösung in abs. Methanol (ca. 10 mL) getropft, bis eine bleibende Braunfärbung eintrat. Der Ansatz wurde auf Raumtemp. erwärmt und für 2 h gerührt (DC-Kontrolle, Cyclohexan, Essigester, 6 : 1). Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in Dichlormethan (30 mL) und 0.1 M Salzsäure (30 mL) aufgenommen. Die Phasen wurden separiert und die org. Phase zweimal mit dest. Wasser (je

15 mL) gewaschen. Das überschüssige Iod wurde mit einer 10 %igen wässr. Natriumthiosulfat-Lösung (20 mL) reduziert und die org. Phase ein weiteres Mal mit dest. Wasser (15 mL) gewaschen. Anschließend wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Cyclohexan, Ethylacetat, 6:1) wurde ein gelbes Öl erhalten.

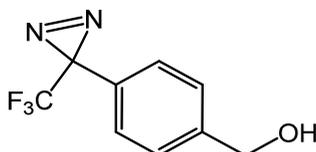
Ausbeute: 682 mg (2.06 mmol, 57 % über drei Stufen, C₁₅H₂₁F₃N₂OSi, M = 330.42 g/mol,) (Lit.^[115]: 58 %);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 6:1): *R_f* = 0.72;

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 7.26 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H, CH_{arom}-2,6), 7.09 (d, ³*J* = 8.5 Hz, 2H, CH_{arom}-3,5), 4.65 (s, 2H, CH₂), 0.84 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.00 (s, 6H, Si(CH₃)₂) ppm;

¹⁹F-NMR (188 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = - 65.88 (s) ppm.

{4-[Trifluormethyl]-diazirin-3-yl]phenyl}methanol (17)



3-{*p*-[*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-hydroxymethyl]phenyl}-3-trifluormethyl)diazirin (16, 300 mg, 908 μmol) wurde mit einer 1 M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in Tetrahydrofuran (~4 mL) versetzt und mit dest. Wasser (0.5 mL) verdünnt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemp. gerührt (DC-Kontrolle, Cyclohexan, Ethylacetat, 6:1). Nach beendeter Reaktion wurde Diethylether (20 mL) zugesetzt, die Phasen getrennt und die org. Phase zweimal mit dest. Wasser (je 15 mL) gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Produkt nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan, Ethylacetat, 5:2) als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 127 mg (589 μmol, 65 %, C₉H₇F₃N₂O, M = 216.16 g/mol) (Lit.^[72]: 92 %);

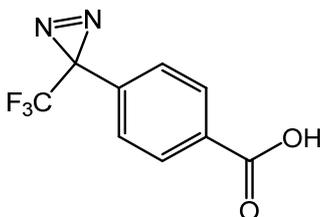
DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 6:1): $R_f = 0.1$;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = 7.38$ (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{arom-2,6}}$), 7.17 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_{\text{arom-3,5}}$), 4.69 (s, 2H, CH_2), 1.71 (s, 1H, OH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = 142.6$ (1C, CN_2), 128.3 (1C, $\text{C}_{\text{arom-4}}$), 127.3 (1C, $\text{C}_{\text{arom-1}}$), 127.1 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-3,5}}$), 126.7 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-2,6}}$), 122.1 (q, $J = 273.7$ Hz, 1C, CF_3), 64.4 (1C, CH_2) ppm;

$^{19}\text{F-NMR}$ (471 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = -65.33$ (s) ppm.

4-[3-(Trifluormethyl)-diazirin-3-yl]benzoesäure (18)



Zu einer Lösung von {4-[Trifluormethyl]-diazirin-3-yl}phenyl}methanol (**17**, 95.0 mg, 440 μmol) in Dioxan (1.6 mL) und 0.1 M wässr. Kaliumhydroxid-Lösung (3.8 mL) wurde portionsweise Kaliumpermanganat (104 mg, 4.46 mmol) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das entstandene Mangan-(IV)-oxid abfiltriert, mit Methanol (40 mL) gewaschen und das Filtrat i. Vak. eingengt. Der Rückstand wurde mit dest. Wasser (20 mL) und Diethylether (20 mL) aufgenommen, die wässr. Phase mit Diethylether (20 mL) extrahiert und die org. Phase mittels einer 1 M Schwefelsäure-Lösung auf pH 2-3 eingestellt. Anschließend wurde die org. Phase mit dest. Wasser bis zur Neutralität gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 74.0 mg (320 μmol , 73 %, $\text{C}_9\text{H}_5\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$, $M = 230.14$ g/mol,) (Lit.^[72]: 72 %);

DC (Chloroform, Ethylacetat, 9:1): $R_f = 0.14$;

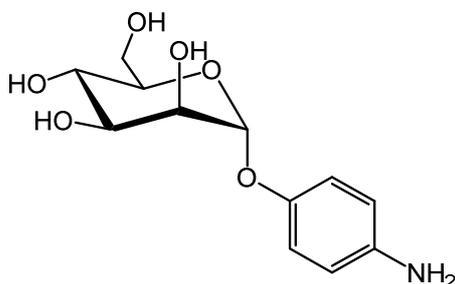
Smp.: 112 °C;

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 8.07 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, CH_{arom}-3,5), 7.24 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, CH_{arom}-2,6), 1.18 (s, 1H, OH) ppm;

¹⁹F-NMR (188 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = - 65.40 (s) ppm;

CI-MS: *m/z* = 231.00 [M+H]⁺.

4-Aminophenyl- α -D-mannopyranosid (19)



4-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid (**2**, 1.85 g, 6.82 mmol) wurde in Methanol (70 mL) suspendiert und mit einer Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle versetzt. In die Reaktionslösung wurde mit Hilfe einer Kanüle Wasserstoff eingeleitet und kräftig gerührt. Nach einer Reaktionszeit von 6 h bei Raumtemp. wurde der Katalysator durch Filtration über einen Spritzenfilter entfernt und das Filtrat i. Vak. eingengt. Es wurde ein farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 1.73 g (6.38 mmol, 94 %, C₁₂H₁₇NO₆, M = 271.27 g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 6:1): *R_f* = 0.38;

Smp.: 164 °C (Lit.^[81]: 164 °C);

Drehwert: [α]_D = 122.0 (T = 21 °C, c = 0.6, CH₃OH);

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 6.90 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, CH_{arom}-2,6), 6.69 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, CH_{arom}-3,5), 5.28 (d, ³J_{1,2} = 1.9 Hz, 1H, H-1), 3.97 (dd, ³J_{2,1} = 1.9 Hz, ³J_{2,3} = 3.4 Hz, 1H, H-2), 3.87 (dd, ³J_{3,2} = 3.4 Hz, ³J_{3,4} = 9.2 Hz, 1H, H-3), 3.78 (dd, ³J_{6',5} = 2.4 Hz, ²J_{6',6} = 11.9 Hz, 1H, H-6'), 3.72 (dd~t, ³J_{4,5} = ³J_{4,3} = 9.4 Hz, 1H, H-4), 3.72 (dd,

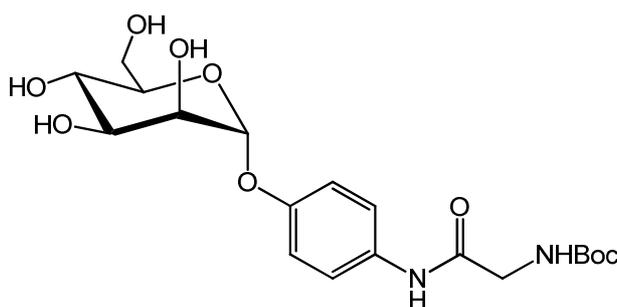
$^3J_{6,5} = 4.8$ Hz, $^2J_{6,6'} = 11.9$ Hz, 1H, H-6), 3.67 (ddd, $^3J_{5,6'} = 2.4$ Hz, $^3J_{5,6} = 4.8$ Hz, $^3J_{5,4} = 9.8$ Hz, 1H, H-5) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOH- d_4 , 300 K): $\delta = 151.0$ (1C, C_{arom-1}), 143.5 (1C, C_{arom-4}), 119.3 (1C, CH_{arom-3,5}), 117.8 (2C, CH_{arom-2,6}), 101.4 (1C, C-1), 75.1 (1C, C-5), 72.5 (1C, C-3), 72.2 (1C, C-2), 68.5 (1C, C-4), 62.7 (1C, C-6) ppm;

MALDI-MS: $m/z = 294.17$ [M+Na] $^+$, 310.31 [M+K] $^+$;

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3320$ (m), 1509 (s), 1430 (w), 1325 (w), 1219 (m), 1112 (m), 1053 (s), 1008 (s), 969 (m), 830 (m), 763 (w), 678 (w) cm^{-1} .

***N*^α-Boc-glycin-[*p*-(α -D-mannopyranosyloxy)]phenylamid (**20**)**



4-Aminophenyl- α -D-mannopyranosid (**19**, 150 mg, 553 μmol) wurde zusammen mit *N*-Boc-glycin (64.6 mg, 369 μmol) und HATU (280 mg, 738 μmol) für 45 min i. Vak. getrocknet. Dann wurden die Feststoffe in abs. DMF (8 mL) gelöst, mit DIPEA (80.0 μL , 443 μmol) versetzt und über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und nach säulenchromatographischer Reinigung (Ethylacetat, Methanol, 6:1) wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 158 mg (369 μmol , quant., $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_9$, $M = 428.43$ g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 6:1): $R_f = 0.15$;

Smp.: 74 $^{\circ}\text{C}$;

Drehwert: $[\alpha]_D = 91.8$ ($T = 21$ $^{\circ}\text{C}$, $c = 0.5$, MeOH);

¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 7.46 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, CH_{arom-2,6}), 7.08 (d, ³J = 8.9 Hz, 2H, CH_{arom-3,5}), 5.43 (d, ³J_{1,2} = 1.8 Hz, 1H, H-1), 3.99 (dd, ³J_{2,1} = 1.8 Hz, ³J_{2,3} = 3.4 Hz, 1H, H-2), 3.89 (dd, ³J_{3,2} = 3.4 Hz, ³J_{3,4} = 9.4 Hz, 1H, H-3), 3.84 (s, 2H, CH_{2-Glycin}), 3.76 (dd, ³J_{6',5} = 2.4 Hz, ²J_{6',6} = 11.9 Hz, 1H, H-6'), 3.75-3.69 (m, 2H, H-6, H-4), 3.61 (ddd, ³J_{5,6'} = 2.4 Hz, ³J_{5,6} = 5.1 Hz, ³J_{5,4} = 9.4 Hz, 1H, H-5), 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm;

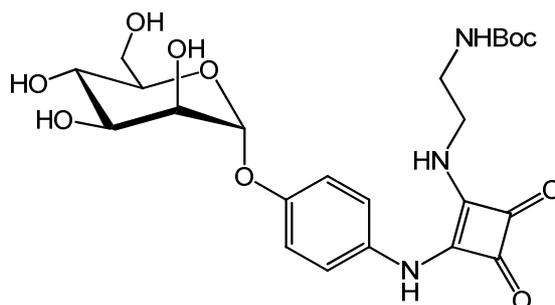
¹³C-NMR (151 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 170.4 (1C, C=O_{Glycin}), 158.6 (1C, C=O_{Boc}), 154.6 (1C, C_{arom-4}), 134.1 (1C, C_{arom-1}), 122.9 (2C, CH_{arom-2,6}), 118.1 (2C, CH_{arom-3,5}), 100.5 (1C, C-1), 80.7 (1C, C(CH₃)₃), 75.4 (1C, C-5), 72.4 (1C, C-3), 72.0 (1C, C-2), 68.4 (1C, C-4), 62.7 (1C, C-6), 45.0 (1C, CH_{2-Glycin}), 28.7 (3C, C(CH₃)₃) ppm;

MALDI-MS: *m/z* = 451.10 [M+Na]⁺;

ESI-MS: *m/z* = 448.3 [M+Na]⁺, 467.3 ([M+K]⁺);

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3388 (m), 2936 (w), 1660 (m), 1508 (s), 1445 (w), 1368 (m), 1220 (m), 1161 (m), 1015 (m), 978 (m), 835 (s), 556 (s) cm⁻¹.

{*N*-[4-(α -D-Mannopyranosyloxy)phenyl]-*N'*-(2'-*tert*-butyloxycarbonylamidoethyl)-quadratsäurediamid (22)}



N-[*p*-(α -D-Mannopyranosyloxy)phenyl]-*N'*-(methoxy)quadratsäureamid (**3**, 90.0 mg, 240 μ mol) wurde in abs. Methanol (5 mL) gelöst. Dann wurden *N*-Boc-ethylendiamin (46.0 mg, 465 μ mol) und Triethylamin (140 μ L) zugegeben und 15 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Neutralisation der Lösung mit dem sauren Ionenaustauscher Amberlyst-A21 und Filtration wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt

säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat, Methanol, 3:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 114 mg (220 μ mol, 92 %, $C_{23}H_{31}N_3O_{10}$, $M = 509.51$ g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 3:1): $R_f = 0.44$;

Smp.: 176-185 °C (Zers.);

Drehwert: $[\alpha]_D = +72.1$ ($T = 25$ °C, $c = 0.3$, CH_3OH);

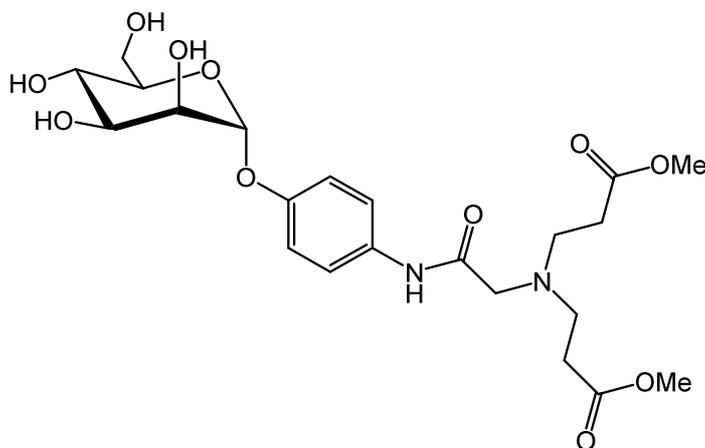
1H -NMR (500 MHz, $MeOH-d_4$, 300 K): $\delta = 7.34$ (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H, $\underline{CH}_{arom-2,6}$), 7.13 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H, $\underline{CH}_{arom-3,5}$), 5.44 (d, $^3J_{1,2} = 1.9$ Hz, 1H, $\underline{H-1}$), 4.00 (dd, $^3J_{2,1} = 1.9$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.5$ Hz, 1H, $\underline{H-2}$), 3.89 (dd, $^3J_{3,2} = 3.5$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.4$ Hz, 1H, $\underline{H-3}$), 3.78 (dd, $^3J_{6,5} = 2.5$ Hz, $^2J_{6,6'} = 11.9$ Hz, 1H, $\underline{H-6}$), 3.75-3.69 (m, 2H, Boc-NH $\underline{CH_2CH_2}$), 3.72 (dd~t, $^3J_{4,3} = ^3J_{4,5} = 9.4$ Hz, 1H, $\underline{H-4}$), 3.71 (dd, $^3J_{6',5} = 5.4$ Hz, $^2J_{6',6} = 11.9$ Hz, 1H, $\underline{H-6'}$), 3.62 (ddd, $^3J_{5,6} = 2.5$ Hz, $^3J_{5,6'} = 5.4$ Hz, $^3J_{5,4} = 9.4$ Hz, 1H, $\underline{H-5}$), 3.29 (mc, 2H, Boc-NH $\underline{CH_2CH_2}$), 1.40 (s, 9H, $C(\underline{CH_3})_3$) ppm;

^{13}C -NMR (126 MHz, $MeOH-d_4$, 300 K): $\delta = 185.0$, 182.6 (2C, $\underline{C=O}_{Quadratsäure}$), 170.7, 165.5 (2C, $\underline{C}_{Quadratsäure}$), 154.7 (1C, \underline{C}_{arom-4}), 134.6 (1C, \underline{C}_{arom-1}), 121.7 (2C, $\underline{CH}_{arom-2,6}$), 118.8 (2C, $\underline{CH}_{arom-3,5}$), 100.6 (1C, $\underline{C-1}$), 80.4 (1C, $\underline{C}(\underline{CH_3})_3$), 75.4 (1C, $\underline{C-5}$), 72.4 (1C, $\underline{C-3}$), 72.0 (1C, $\underline{C-2}$), 68.4 (1C, $\underline{C-4}$), 62.7 (1C, $\underline{C-6}$), 45.3 (1C, Boc-NH $\underline{CH_2CH_2}$), 42.4 (1C, Boc-NH $\underline{CH_2CH_2}$), 28.7 (3C, $C(\underline{CH_3})_3$) ppm;

MALDI-MS: $m/z = 532.16$ $[M+Na]^+$, 548.14 $[M+K]^+$;

ESI-MS: $m/z = 532.3$ $[M+Na]^+$;

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3359$ (m), 2970 (w), 2933 (w), 1798 (w), 1689 (m), 1650 (m), 1609 (w), 1550 (s), 1514 (s), 1454 (s), 1285 (m), 1118 (m), 1021 (m), 918 (w), 881 (w), 826 (m), 765 (m) cm^{-1} .

***N*^α,*N*^α-Bis-(propansäuremethylester)glycin-*p*-(*α*-D-mannopyranosyloxy)phenylamid (23)**

N^α-Boc-glycin-[*p*-(*α*-D-mannopyranosyloxy)]phenylamid (**20**, 536 mg, 1.25 mmol) wurde in 40 % iger wässr. Trifluoressigsäurelösung (20 mL) gelöst und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Der Umsatz der Entschützung wurde per DC-Kontrolle verfolgt. Nach beendeter Reaktion wurde das Produkt lyophilisiert. Ohne weitere Aufreinigung wurde das freie Amin in der nächsten Reaktion weiter umgesetzt. Dazu wurde das Mannosid mit frisch destilliertem Methylacrylat (20.0 mL) und etwas Methanol (5 mL) zur besseren Löslichkeit versetzt und 3 d bei 90 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend i. Vak. eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Ethylacetat, Methanol, 3:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 325 mg (649 μmol, 52 %, C₂₂H₃₂N₂O₁₁, M = 500.50 g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 3:1): *R*_f = 0.48;

Smp.: 164-166°C;

Drehwert: [α]_D = 98.0 (T = 21 °C, c = 0.2, MeOH);

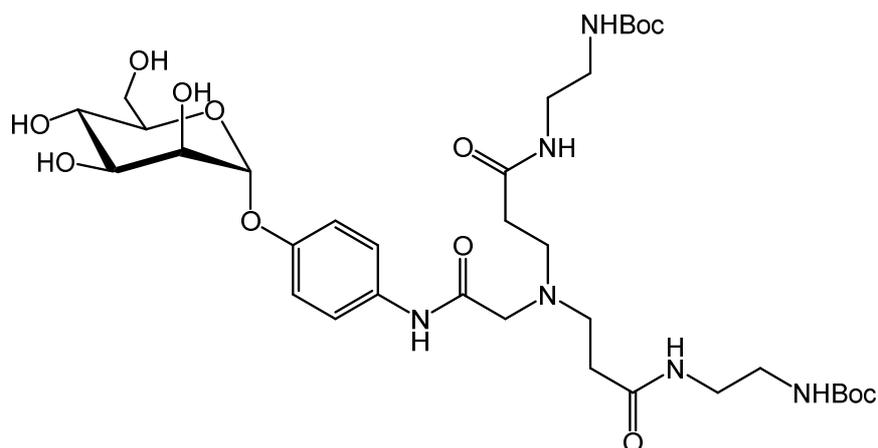
¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 7.67-7.63 (m, 2H, CH_{arom}-2,6), 7.15-7.11 (m, 2H, CH_{arom}-3,5), 5.48 (d, ³*J*_{1,2} = 1.9 Hz, 1H, H-1), 4.03 (dd, ³*J*_{2,1} = 1.9 Hz, ³*J*_{2,3} = 3.4 Hz, 1H, H-2), (dd, ³*J*_{3,2} = 3.4 Hz, ³*J*_{3,4} = 9.5 Hz, 1H, H-3) 3.80 (dd, ³*J*_{6,5} = 2.8 Hz, ²*J*_{6,6'} = 12.0 Hz, 1H, H-6), 3.77-3.72 (m, 2H, H-4, H-6'), 3.68 (s, 6H, 2x OCH₃), 3.69-3.62 (m, 1H, H-5), 3.29 (s, 2H, CH₂-Glycin), 2.90 (t, ³*J* = 6.3 Hz, 4H, N(CH₂CH₂)₂), 2.58 (t, ³*J* = 6.3 Hz, 4H, N(CH₂CH₂)₂) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, MeOH- d_4 , 300 K): δ = 174.7 (1C, $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 172.0 (1C, $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 154.7 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-4}}$), 133.9 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-1}}$), 122.7 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-2,6}}$), 118.1 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-3,5}}$), 100.5 (1C, $\underline{\text{C}}-1$), 75.4 (1C, $\underline{\text{C}}-5$), 72.4 (1C, $\underline{\text{C}}-3$), 72.0 (1C, $\underline{\text{C}}-2$), 68.4 (1C, $\underline{\text{C}}-4$), 62.7 (1C, $\underline{\text{C}}-6$), 60.4 (1C, $\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 52.2 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 51.3 (2C, $\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2)_2$), 33.1 (2C, $\text{N}(\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2)_2$) ppm;

ESI-MS: m/z = 523.19 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3266 (m), 2956 (w), 2850 (w), 1661 (s), 1541 (m), 1509 (m), 1440 (m), 1183 (s), 1131 (s), 987 (w), 838 (m), 799 (m), 721 (m) cm^{-1} .

N^α, N^α -Bis-(propansäure(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethylamid)glycin-4'-(α -D-mannopyranosyloxy)phenylamid (24)



N^α, N^α -Bis-(propansäuremethylester)glycin-*p*-(α -D-mannopyranosyloxy)phenylamid (23, 325 mg, 649 μmol) wurde in Methanol (30 mL) gelöst und mit Ethylendiamin (1 mL) 3 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wurde anschließend mit sauren Ionenaustauscher Amberlyst-A21 neutralisiert. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol mit Di-*tert*-butyl-dicarbonat (284 mg, 1.30 mmol) versetzt und 13 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat, Methanol, 3:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 110 mg (145 μmol , 22 %, $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_{13}$, $M = 756.84$ g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 3:1): $R_f = 0.3$;

Smp.: 175 °C;

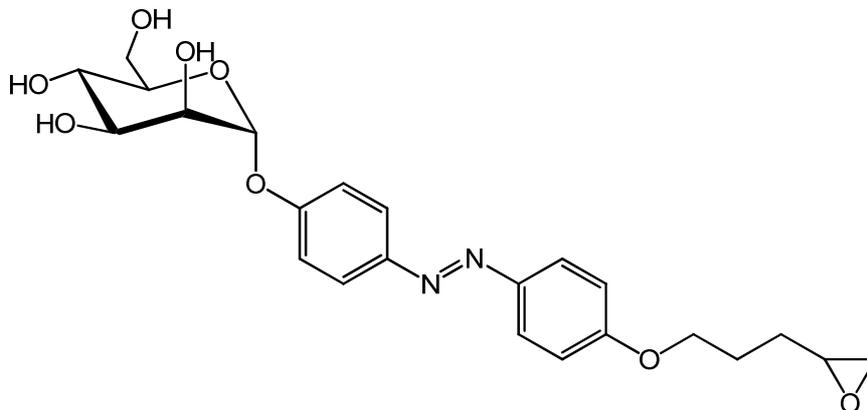
Drehwert: $[\alpha]_D = 53.8$ (T = 21 °C, c = 0.3, MeOH);

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 300 K): $\delta = 7.68$ -7.64 (m, 2H, CH_{arom}-2,6), 7.14-7.11 (m, 2H, CH_{arom}-3,5), 5.47 (d, ³J_{1,2} = 1.8 Hz, 1H, H-1), 4.03 (dd, ³J_{2,1} = 1.8 Hz, ³J_{2,3} = 3.4 Hz, 1H, H-2), 3.92 (dd, ³J_{3,2} = 3.4 Hz, ³J_{3,4} = 9.5 Hz, 1H, H-3), 3.80 (dd, ³J_{6,5} = 2.6 Hz, ²J_{6,6'} = 11.9 Hz, 1H, H-6), 3.79-3.73 (m, 2H, H-4, H-6'), 3.64 (ddd, ³J_{5,6} = 2.6 Hz, ³J_{5,6'} = 5.1 Hz, ³J_{5,4} = 9.7 Hz, 1H, H-5), 3.29 (s, 2H, CH₂-Glycin), 3.28 (t, ³J = 5.9 Hz, 4H, (NCH₂CH₂NHBoc)₂), 3.17 (t, ³J = 5.9 Hz, 4H, (NCH₂CH₂NHBoc)₂), 2.90 (t, ³J = 6.6 Hz, 4H, N_{Glycin}(CH₂CH₂CO)₂), 2.44 (t, ³J = 6.6 Hz, 4H, N_{Glycin}(CH₂CH₂CO)₂), 1.45 (s, 18H, 2x C(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, TMS, 300 K): $\delta = 174.7$ (2C, (CON-Ethyl-NHBoc), 172.0 (1C, C=O_{Glycin}), 158.5 (2C, C=O_{Boc}), 154.7 (1C, C_{arom}-4'), 134.0 (1C, C_{arom}-1'), 122.9 (2C, CH_{arom}-2',6'), 118.1 (2C, CH_{arom}-3',5'), 100.5 (1C, C-1), 80.1 (1C, C(CH₃)₃), 75.4, (1C, C-5), 72.4 (1C, C-3), 72.0 (1C, C-2), 68.4 (1C, C-4), 62.7 (1C, C-6), 59.8 (1C, CH₂-Glycin), 51.6 (2C, N_{Glycin}(CH₂CH₂CO)₂), 41.0 (2C, NCH₂CH₂NHBoc), 40.6 (2C, NCH₂CH₂NHBoc), 34.6 (2C, N_{Glycin}(CH₂CH₂CO)₂), 28.8 (9C, 2x C(CH₃)₃) ppm;

ESI-MS: $m/z = 757.5$ [M+H]⁺;

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3284$ (m), 2930 (w), 1643 (m), 1508 (s), 1365 (m), 1245 (m), 1230 (m), 1166 (s), 1008 (s), 831 (m) cm⁻¹.

4-[4'-(Propyl-3''-oxiran)hydroxyphenyl]azo]phenyl- α -D-mannopyranosid (25)

1-Brompropen (**35**, 500 mg, 3.36 mmol) in Dichlormethan (10 mL) wurde auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde portionsweise *meta*-Chlorperbenzoesäure (869 mg, 5.04 mmol) zugegeben und auf Raumtemp. erwärmt. Die Reaktionslösung wurde 14 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde dest. Wasser (10 mL) zugegeben und mit 0.1 M Natriumhydroxidlösung neutralisiert. Die Phasen wurden getrennt und die wässr. Phase mit Dichlormethan (20 mL) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt des 2-(3-Brompropyl)oxirans (**36**, M = 165.03 g/mol, C₅H₉BrO) wurde direkt weiter umgesetzt.

Kaliumcarbonat (22.0 mg, 159 μ mol) wurde in DMF (1.5 mL) suspendiert. Anschließend wurde 4-(Phenol)-azophenyl- α -D-mannopyranosid (**34**, 40.0 mg, 106 μ mol) hinzugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurde langsam Epoxid **36** (35 mg, 213 μ mol) in DMF (1 mL) zugetropft. Es wurde 4 h bei Raumtemp. und 2 h bei 70 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlormethan, Methanol, 9:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 32.6 mg (70.8 μ mol, 67 %, M = 460.47 g/mol, C₂₃H₂₈N₂O₈);

DC (Dichlormethan, Methanol, 9:1): R_f = 0.2;

Smp.: 171 °C;

Drehwert: $[\alpha]_D = 260$ (T = 21 °C, c = 0.02, MeOH);

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 7.86-7.80 (m, 4H, CH_{arom}-3,5,2',6'), 7.27-7.23 (m, 2H, CH_{arom}-2,6), 7.13-7.08 (m, 2H, CH_{arom}-3',5'), 5.50 (d, ³J_{1,2} = 1.7 Hz, 1H, H-1), 5.10-5.06 (m, 1H, OH), 4.85 (d, ³J = 5.8 Hz, 1H, OH), 4.78 (d, ³J = 5.8 Hz, 1H, OH), 4.46 (t, ³J = 5.8 Hz, 1H, OH), 4.12 (t, ³J = 6.5 Hz, CH₂-1), 3.88-3.84 (m, 1H, H-2), 3.73-3.67 (m, 1H, H-3), 3.63-3.57 (m, 1H, H-6), 3.54-3.44 (m, 1H, H-4), 3.47 (dd, ³J_{6',5} = 6.0 Hz, ²J_{6,6'} = 11.9 Hz, 1H, H-6'), 3.41-3.28 (m, 1H, H-5), 3.00-2.96 (m, 1H, CHH_{Oxiran}), 2.49-2.46 (m, 1H, CHH_{Oxiran}), 1.92-1.81 (m, 2H, CH₂-2), 1.73-1.65 (m, 1H, CHH-3), 1.64-1.56 (m, 1H, CHH-3) ppm;

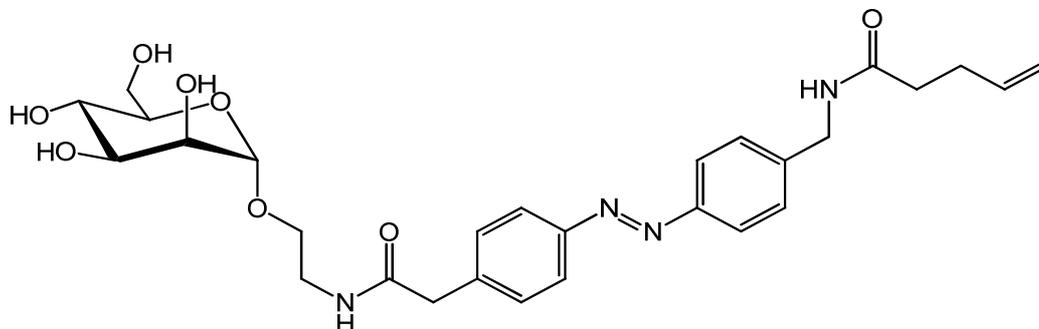
¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 160.9 (1C, C_{arom}-4'), 158.4 (1C, C_{arom}-1), 146.9 (1C, C_{arom}-4), 146.1 (1C, C_{arom}-1'), 124.2 (2C, CH_{arom}-2,6), 123.9 (2C, CH_{arom}-3',5'), 117.1 (2C, CH_{arom}-3,5), 115.0 (2C, CH_{arom}-2',6'), 98.7 (1C, C-1), 75.1 (1C, C-5), 70.6 (1C, C-3), 69.9 (1C, C-2), 67.6 (1C, CH₂-1), 66.6 (1C, C-4), 61.0 (1C, C-6), 51.2 (1C, CH_{Oxiran}), 46.1 (1C, CH₂-Oxiran), 28.5 (1C, CH₂-3), 25.2 (1C, CH₂-2) ppm;

MALDI-MS: *m/z* = 483.17 [M+Na]⁺;

HRESI-MS: *m/z* = 461.19202 [M+H]⁺ (M = 461.19185, ber. für C₂₃H₂₈N₂O₈+H);

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3368 (m), 2924 (s), 1597 (m), 1580 (m), 1392 (w), 1236 (s), 1105 (m), 1007 (s), 842 (m), 638 (w), 546 (m) cm⁻¹.

2-Phenyl-(4'-azo (4''benzylpent-4'''-enamid))-essigsäure-(α-D-mannopyranosyloxy)-ethylamid (27)



Aminoethyl-α-D-mannopyranosid (**48**, 38.0 mg, 170 μmol) wurde zusammen mit 2-Phenyl-(4'-azo(4''benzylpent-4'''-enamid))-essigsäure (**47**, 50.0 mg, 142 μmol) und HATU (70.0 mg, 185 μmol) für 1 h i. Vak. getrocknet. Die Feststoffe wurden unter Stickstoffatmosphäre in abs.

DMF (3 mL) gelöst und mit DIPEA (0.030 mL, 176 μ mol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 13 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Dichlormethan, Methanol, 5:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 16.8 mg (30.0 μ mol, 21 %, $C_{28}H_{36}N_4O_8$, M = 556.61 g/mol);

DC (Dichlormethan, Methanol, 5:1): $R_f = 0.2$;

Smp.: 205 °C;

Drehwert: $[\alpha]_D = 42.3$ (T = 21 °C, c = 0.2, MeOH);

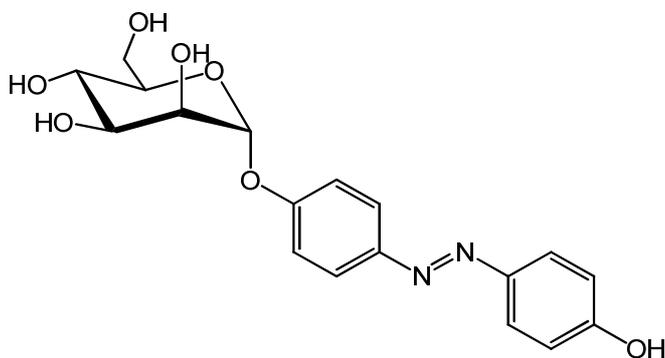
1H -NMR (600 MHz, MeOH- d_4 , 300 K): $\delta = 7.89$ -7.85 (m, 4H, $\underline{C}H_{\text{arom-3',5',2'',6''}}$), 7.48, 7.46 (2d, $^3J = 8.4$ Hz, 4H, $\underline{C}H_{\text{arom-2',6',3'',5''}}$), 5.89-5.82 (m, 1H, $\underline{C}H=CH_2$), 5.11-5.06 (m, 1H, $\underline{C}H=\underline{C}H$), 5.02-4.98 (m, 1H, $\underline{C}H=\underline{C}H$), 4.77-4.75 (m, 1H, $\underline{H-1}$), 4.45 (s, 2H, $\underline{C}H_2NH$ -Pentensäure), 3.84-3.79 (m, 2H, $\underline{H-2}$, $\underline{H-6}$), 3.79-3.74 (m, 1H, $\underline{O}CH_2\underline{C}H$), 3.72-3.62 (m, 2H, $\underline{H-3}$, $\underline{H-6'}$), 3.63 (s, 2H, $\underline{C}H_2$ -Essigsäure), 3.62-3.52 (m, 3H, $\underline{H-5}$, $\underline{H-4}$, $\underline{O}CH$), 3.49-3.38 (m, 2H, $\underline{O}CH_2\underline{C}H_2NH$), 2.43-2.34 (m, 4H, $\underline{C}H_2\underline{C}H_2CH=CH_2$) ppm;

^{13}C -NMR (151 MHz, MeOH- d_4 , 300 K): $\delta = 175.4$ (1C, $\underline{C}=\underline{O}$ Essigsäure), 173.6 (1C $\underline{C}=\underline{O-1''''}$), 153.2, 152.9 (2C, $\underline{C}_{\text{arom-4',1''}}$), 143.6 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-4''}}$), 140.5 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-1'}}$), 138.2 (1C, $\underline{C}H=CH_2$), 131.0, 129.3 (4C, $\underline{C}H_{\text{arom-2',6',3'',5''}}$), 124.0, 123.9 (4C, $\underline{C}H_{\text{arom-3',5',2'',6''}}$), 116.0 (1C, $\underline{C}H=\underline{C}H_2$), 101.7 (1C, $\underline{C-1}$), 74.8 (1C, $\underline{C-5}$), 72.6 (1C, $\underline{C-3}$), 72.1 (1C, $\underline{C-2}$), 68.6 (1C, $\underline{C-4}$), 67.2 (1C, $\underline{O}CH_2$), 62.9 (1C, $\underline{C-6}$), 43.7, 43.6 (2C, $\underline{C}H_2$ -Essigsäure, $\underline{C}H_2NH$ -Pentensäure), 40.6 (1C, $\underline{O}CH_2\underline{C}H_2NH$), 36.4, 31.0 (2C, $\underline{C}H_2\underline{C}H_2CH=CH_2$) ppm;

MALDI-MS: $m/z = 579.47$ $[M+Na]^+$;

HRESI-MS: $m/z = 557.26087$ $[M+H]^+$ (M = 557.26059, ber. für $C_{28}H_{36}N_4O_8+H$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3279$ (m), 2924 (w), 1632 (s), 1545 (m), 1416 (w), 1031 (s), 911 (w), 835 (m), 679 (m), 562 (s) cm^{-1} .

(4'-Hydroxyphenyl)-4-azophenyl- α -D-mannopyranosid (34)

4-Aminophenyl- α -D-mannopyranosid (**19**, 1.50 g, 5.53 mmol) wurde in 1 M Salzsäurelösung (10 mL) suspendiert. Unter Rühren wurde bei 0 °C Natriumnitritlösung (516 mg, 7.47 mmol, in 1.95 mL dest. Wasser) zutropft. Danach wurde noch kaltes Methanol (19 mL) zu der Reaktionsmischung gegeben. Anschließend wurde Phenol (522 mg, 5.55 mmol) in Methanol (2.7 mL) gelöst und mit Kaliumhydroxid (582 mg, 10.5 mmol) versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und langsam zu der Suspension unter Rühren und Eiskühlung getropft. Es wurde 12 h bei Raumtemp. gerührt. Das Rohprodukt wurde mit einer 1 M Salzsäurelösung ausgefällt. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit dest. Wasser (50 mL) gewaschen. Anschließend wurde aus einem Wasser/Methanol-Gemisch umkristallisiert und erneut mit dest. Wasser (50 mL) gewaschen. Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.29 g (3.43 mmol, 62 %, M = 376.36 g/mol, C₁₈H₂₀N₂O₇);

DC (Dichlormethan, Methanol, 9:1): R_f = 0.18;

Smp.: 206 °C (Lit.^[92]: 206-207 °C);

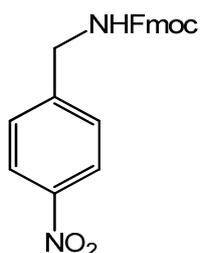
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 7.82-7.78 (m, 2H, CH_{arom}-2,6), 7.77-7.72 (m, 2H, CH_{arom}-3',5'), 7.27-7.20 (m, 2H, CH_{arom}-3,5), 6.95-6.89 (m, 2H, CH_{arom}-2',6'), 5.49 (d, ³J_{1,2} = 1.6 Hz, 1H, H-1), 5.10 (d, ³J = 4.0 Hz, 1H, OH), 4.86 (d, ³J = 5.2 Hz, 1H, OH), 4.78 (d, ³J = 5.2 Hz, 1H, OH), 4.49 (t, ³J = 5.2 Hz, 1H, OH), 3.89-3.83 (m, 1H, H-2), 3.74-3.67 (m, 1H, H-3), 3.64-3.56 (m, 1H, H-6), 3.55-3.27 (m, 3H, H-4, H-5, H-6')

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆, 300 K): δ = 160.9 (1C, C_{arom}-4'), 158.6 (1C, C_{arom}-1), 147.5 (1C, C_{arom}-4), 145.7 (2C, C_{arom}-1'), 124.9 (2C, CH_{arom}-3',5'), 124.2 (2C, CH_{arom}-2,6), 117.5

(2C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom}}-3,5}$), 116.3 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom}}-2',6'}$), 99.2 (1C, $\underline{\text{C}}-1$), 75.6 (1C, $\underline{\text{C}}-5$), 71.1 (1C, $\underline{\text{C}}-3$), 70.4 (1C, $\underline{\text{C}}-2$), 67.1 (1C, $\underline{\text{C}}-4$), 61.5 (1C, $\underline{\text{C}}-6$) ppm;

ESI-MS: $m/z = 377.0$ [M+H]⁺.

(Fluorenylmethyl)-*N*-(4-nitrobenzyl)carbammat (38)^[96]



4-Nitrobenzylamin-Hydrochlorid (**37**, 1.00 g, 5.30 mmol) wurde in Dichlormethan (50 mL) gelöst und mit DIPEA (4.07 mL, 24.9 mmol) versetzt. Anschließend wurde Fmoc-Chlorid (1.37 g, 5.30 mmol) in Dichlormethan (10 mL) gelöst und zu der Reaktionslösung gegeben. Es wurde 12 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde dreimal mit 10 %iger Salzsäure (250 mL) extrahiert, die org. Phase mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (200 mL), dest. Wasser (200 mL) und ges. Natriumchloridlösung (200 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Trockenmittel abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan, Ethylacetat, 2:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.80 g (4.53 mmol, 85 %, C₂₂H₁₈N₂O₄, M = 374.39 g/mol) (Lit.^[96]:92 %);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 2:1): $R_f = 0.32$;

Smp.: 148 °C;

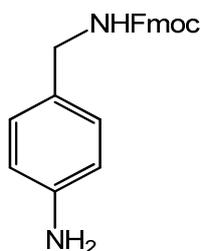
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): $\delta = 8.17$ (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom}}-3,5}$), 7.77 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom}}-\text{Fmoc}}$), 7.59 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom}}-\text{Fmoc}}$), 7.41 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom}}-\text{Fmoc}}$), 7.37 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom}}-2,6}$), 7.32 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom}}-\text{Fmoc}}$), 5.17 (br.s, 1H, $\underline{\text{NH}}$), 4.54 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_2-\text{Fmoc}}$), 4.45 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, $\underline{\text{NH}}-\underline{\text{C}}_{\text{H}_2}$), 4.22 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 1H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}}_{\text{Fmoc}}$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = 156.5$ (1C, $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 147.3 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-4}}$), 146.9 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-Fmoc}}$), 143.7 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-Fmoc}}$), 141.4 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-1}}$), 127.9 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-2,6}}$), 127.8 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}$), 127.1 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}$), 124.9 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}$), 123.9 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-3,5}}$), 120.0 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}$), 66.7 (1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Fmoc}$), 47.3 (1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Fmoc}}$), 44.3 (1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$) ppm;

HREI-MS: $m/z = 374.1281$ [M] $^+$ ($\text{M} = 374.1266$, ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3368$ (w), 3323 (m), 1697 (s), 1526 (s), 1450 (m), 1345 (s), 1259 (s), 858 (m), 835 (m), 757 (s), 740 (s), 730 (s), 715 (s) cm^{-1} .

***N*-(4-Aminobenzyl)-(fluorenylmethyl)carbamate (39)^[96]**



4-Nitrobenzylfluorenylmethoxycarbamate (**38**, 1.18 g, 3.15 mmol) wurde in einer 2:1 Mischung aus Ethanol und Dioxan (90 mL) suspendiert. Unter Stickstoffatmosphäre wurde eine Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle zugegeben und anschließend Wasserstoff mit einer Kanüle durch die Lösung geleitet. Unter Wasserstoffatmosphäre wurde für 3.5 h bei Raumtemp. gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über einen Spritzenfilter abgetrennt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 803 mg (2.33 mmol, 74 %, $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{M} = 344.41$ g/mol) (Lit.^[96]: 80 %);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 2:1): $R_f = 0.2$;

Smp.: 146 °C;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = 8.17$ (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-3,5}}$), 7.78 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}$), 7.59 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}$), 7.42 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}$), 7.37 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-2,6}}$), 7.32 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}$), 5.19

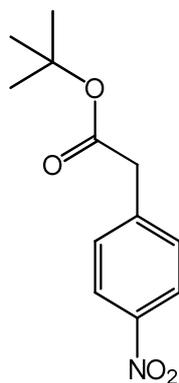
(br. s, 1H, NH), 4.54 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, $\underline{\text{CH}}_2\text{-Fmoc}$), 4.45 (d, $^3J = 6.2$ Hz, 2H, $\text{NH}\underline{\text{CH}}_2$), 4.22 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 1H, $\underline{\text{CH}}_{\text{Fmoc}}$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = 156.5$ (1C, $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 147.3 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-Fmoc}}$), 146.0 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-4}}$), 143.7 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-Fmoc}}$), 141.4 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-1}}$), 127.9 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom-2,6}}}$), 127.8 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}}$), 127.1 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}}$), 124.9 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}}$), 123.9 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom-3,5}}}$), 120.0 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{arom-Fmoc}}}$), 66.7 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_2\text{-Fmoc}}$), 47.3 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{Fmoc}}}$), 44.3 (1C, $\text{NH}\underline{\text{C}}_{\text{H}_2}$) ppm;

HREI-MS: m/z : 344.1525 $[\text{M}]^+$ ($M = 344.1525$ für $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3306$ (m), 1689 (s), 1516 (s), 1254 (s), 1447 (m), 827 (m), 756 (m), 740 (s), 731 (s) cm^{-1} .

2-(4-Nitrophenyl)essigsäure-*tert*-butylester (41)



Variante 1:^[98]

4-Nitrophenylessigsäure (**40**, 1.00 g, 5.52 mmol), *tert*-Butanol (537 μL , 5.63 mmol) und Triethylamin (1.82 mL, 13.2 mmol) wurden in Toluol (30 mL) gelöst, zu einer Suspension aus 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid (1.69 g, 6.62 mmol) in Toluol (25 mL) gegeben und unter Rückfluss 14 h erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan, Ethylacetat, 6:1) an Kieselgel gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 944 mg (3.98 mmol, 72 %, $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$, $M = 237.25$ g/mol);

Variante 2:^[116]

4-Nitrophenylessigsäure (**40**, 15.0 g, 83.0 mmol) wurde in Chloroform (250 mL) gelöst. Anschließend wurden Pyridin (33.0 mL, 40.8 mmol) und *tert*-Butanol (78.0 mL, 83.0 mmol) zugegeben. Zu der Lösung wurde über 5 min Phosphorylchlorid (9.93 mL, 109 mmol) getropft. Es wurde 5 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wurde mit Dichlormethan (30 mL) und eisgekühlter 10 % ige Salzsäurelösung (20 mL) versetzt. Die org. Phase wurde abgetrennt, mit ges. Natriumchloridlösung (25 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan, Ethylacetat, 9:1→Cyclohexan, Ethylacetat, 6:1) an Kieselgel gereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 16.0 g (67.0 mmol, 81 %, C₁₂H₁₅NO₄, M = 237.25 g/mol) (Lit.^[116]: 95 %);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 8:1): $R_f = 0.54$;

Smp.: 36 °C;

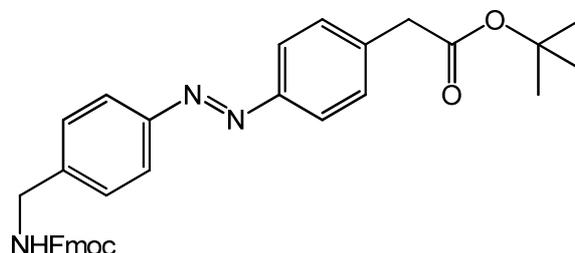
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): $\delta = 8.80$ (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H, CH_{arom-3,5}), 7.37 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H, CH_{arom-2,6}), 3.57 (s, 2H, CH₂), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): $\delta = 169.4$ (1C, C=O), 142.1 (2C, C_{arom-1,4}), 130.2 (2C, CH_{arom-2,6}), 123.7 (2C, CH_{arom-3,5}), 81.8 (1C, C(CH₃)₃), 42.4 (1C, CH₂), 28.0 (3C, C(CH₃)₃) ppm;

MALDI-MS: $m/z = 238.099$ [M+H]⁺;

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2978$ (m), 1724 (s), 1513 (s), 1343 (s), 1328 (s), 1137 (s), 882 (m), 854 (s) cm⁻¹.

2-(Phenyl-{4'-azo-[4''-(fluorenylmethoxycarbonylamino)methyl]phenyl})-essigsäure-tert-butylester (43)



4-Nitrophenylessigsäure (**41**, 1.13 g, 4.78 mmol) wurde nach der AAV 1 zur Nitrosoverbindung **42** umgesetzt. Diese wurde in Eisessig (100 mL) gelöst und zu einer Lösung aus 4-Aminobenzylfluorenylmethoxycarbamat (**39**, 822 mg, 2.39 mmol) in Eisessig (75 mL) gegeben. Diese Reaktionslösung wurde für 48 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan, Ethylacetat, 6:1 → 2:1). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 824 mg (1.50 mmol, 63 % (über zwei Stufen), $C_{34}H_{33}N_3O_4$, $M = 547.64$ g/mol);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 3:1): $R_f = 0.58$;

Smp.: 114 °C;

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 7.91$ -7.85 (m, 4H, $CH_{\text{arom-}3',5',2'',6''}$), 7.77 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $CH_{\text{arom-Fmoc}}$), 7.61 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $CH_{\text{arom-Fmoc}}$), 7.43 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 4H, $CH_{\text{arom-}2',6',3'',5''}$), 7.39 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $CH_{\text{arom-Fmoc}}$), 7.32 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $CH_{\text{arom-Fmoc}}$), 5.18 (br s, 1H, NH), 4.51 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 2H, $CH_2\text{-Fmoc}$), 4.45 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, $CH_2\text{NH}$), 4.24 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, CH_{Fmoc}) 3.61 (s, 2H, $CH_2\text{C=O}$), 1.46 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm;

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 169.3$ (1C, $PhCH_2\text{C=O}$), 155.5 (1C, C=O_{Fmoc}), 151.0 (2C, C_{Fmoc}), 150.6 (2C, $\text{C}_{\text{arom-}4',1''}$), 142.8 (2C, C_{Fmoc}), 140.3 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}4''}$), 136.9 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}1'}$), 129.0 (2C, $CH_{\text{arom-}2',6'}$), 127.1 (2C, $CH_{\text{arom-}3'',5''}$), 126.7 (2C, $CH_{\text{arom-Fmoc}}$), 126.0 (2C, $CH_{\text{arom-Fmoc}}$), 124.0 (2C, $CH_{\text{arom-Fmoc}}$), 122.1, 122.0 (4C, $CH_{\text{arom-}3',5',2'',6''}$), 119.0 (2C, $CH_{\text{arom-Fmoc}}$), 80.1 (1C, $\text{C}(CH_3)_3$), 65.7 (1C, $CH_2\text{-Fmoc}$), 46.3 (1C, CH_{Fmoc}), 43.7 (1C, $CH_2\text{NH}$), 41.6 (1C, $CH_2\text{C=O}$), 27.0 (3C, $\text{C}(CH_3)_3$) ppm;

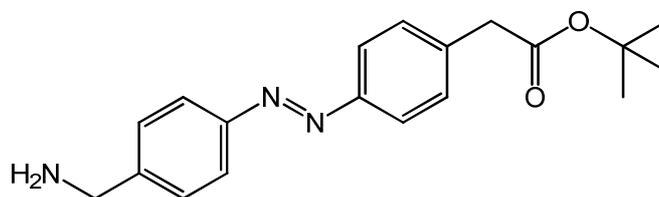
ESI-MS: $m/z = 548.243$ $[M+H]^+$;

HREI-MS: $m/z = 547.2470$ [M]⁺ (M = 527.2471, ber. für C₃₄H₃₃N₃O₄);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3336$ (m), 2977 (w), 1729 (m), 1687 (s), 1535 (m), 1450 (w), 1274 (m), 1146 (s), 988 (w), 841 (w), 757 (m), 740 (m), 731 (m) cm⁻¹;

Elementaranalyse: C₃₄H₃₃N₃O₄, ber. C 74.57, H 6.07, N 7.67, gef. C 74.34, H 6.00, N 7.58 %.

2-(Phenyl-{4'-azo-[4''-(aminomethyl)phenyl]})-essigsäure-*tert*-butylester (44)



2-(Phenyl-{4'-azo-[4''-(fluorenylmethoxycarbonylaminomethyl)phenyl]})-essigsäure-*tert*-butylester (**43**, 136 mg, 248 μ mol) wurde in abs. DMF (6 mL) gelöst, mit Piperidin (1.2 mL) versetzt und 13 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat, Methanol, 6:1). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 72.0 mg (221 μ mol, 89 %, C₁₉H₂₃N₃O₂, M = 325.40 g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 6:1): $R_f = 0.12$;

Smp.: 136 °C;

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 300 K): $\delta = 7.90$ (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, CH_{arom}-2'',6''), 7.86 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, CH_{arom}-3',5'), 7.68 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, CH_{arom}-3'',5''), 7.48 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H, CH_{arom}-2',6'), 4.05 (s, 2H, CH₂NH₂), 3.69 (s, 2H, CH₂COO), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm;

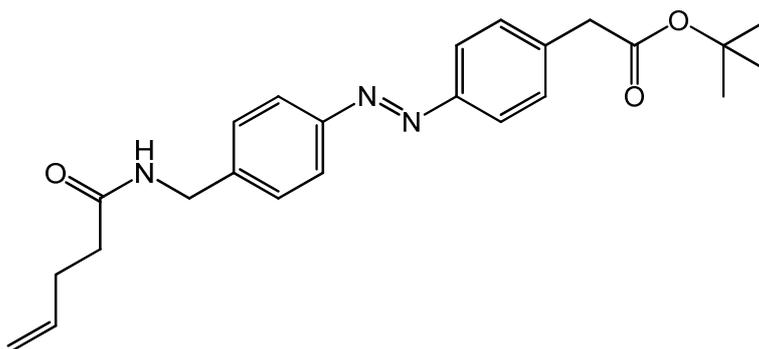
¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 300 K): $\delta = 170.0$ (1C, C=O), 151.4 (1C, C_{arom}-1'), 150.7 (1C, C_{arom}-4'), 140.2 (1C, C_{arom}-4''), 138.7 (1C, C_{arom}-1''), 130.4 (2C, CH_{arom}-2',6'), 129.7 (2C, CH_{arom}-3',5'), 122.54 (2C, CH_{arom}-2'',6''), 122.50 (2C, CH_{arom}-3'',5''), 80.4 (1C, C(CH₃)₃), 42.7 (1C, CH₂NH₂), 41.4 (1C, CH₂COO), 27.7 (3C, C(CH₃)₃) ppm;

ESI-MS: $m/z = 326.18$ [M+H]⁺;

HREI-MS: $m/z = 325.1782 [M]^+$, ($M = 325.1790$, ber. für $C_{19}H_{23}N_3O_2$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2931$ (m), 1724 (s), 1525 (m), 1365 (m), 1245 (s), 1230 (s), 1140 (s), 833 (m) cm^{-1} .

2-(Phenyl-{4'-azo-[4''-(pent-4-enamidomethyl)phenyl]})-essigsäure-*tert*-butylester (46)



Zu einer Suspension aus 2-(Phenyl-{4'-azo-[4''-(aminomethyl)phenyl]})-essigsäure-*tert*-butylester (**44**, 74.0 mg, 227 μ mol), Pyridin (20.0 μ L, 250 μ mol) und DMAP (1.34 mg, 11.0 μ mol) in Dichlormethan (5 mL) wurde tropfenweise Pentensäurechlorid (**45**, 38.0 μ L, 341 μ mol) bei 0 °C gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemp. erwärmt und 10 min gerührt. Dann wurde 10 % ige Salzsäurelösung (10 mL) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässr. Phase zweimal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und ges. Natriumchloridlösung gewaschen (je 30 mL) und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat, Cyclohexan, 3:1→2:1). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 75.7 mg (186 μ mol, 82 %, $C_{24}H_{29}N_3O_3$, $M = 407.51$ g/mol);

DC (Dichlormethan, Ethylacetat, 1:1): $R_f = 0.7$;

Smp.: 114 °C;

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 7.89$ -7.85 (m, 4H, CH_{arom} -3',5',2'',6''), 7.44-7.39 (m, 4H, CH_{arom} -2',6',3'',5''), 5.84 (mc, 2H, NH , $CH=CH_2$), 5.09 (dd, $^3J = 17.2$ Hz, $^2J = 1.6$

Hz, 1H, CH=CHH), 5.03 (dd, $^3J = 10.2$ Hz, $^2J = 1.6$ Hz, 1H, CH=CHH), 4.52 (d, $^3J = 5.9$ Hz, 2H, CH₂NH), 3.60 (s, CH₂COOC(CH₃)₃), 2.45 (mc, 2H, CH₂CH=CH₂), 2.35 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, CH₂CH₂CH=CH₂), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 172.2 (1C, NHC=O), 170.4 (1C, COOC(CH₃)₃), 152.0 (1C, C_{arom}-4'), 151.5 (1C, C_{arom}-1''), 141.3 (1C, C_{arom}-4''), 138.0 (1C, C_{arom}-1'), 136.9 (1C, CH₂=CHCH₂), 130.0 (2C, CH_{arom}-2',6'), 128.4 (2C, CH_{arom}-3'',5''), 123.2, 123.0 (2CH, CH_{arom}-3',5',2'',6''), 115.8 (1C, CH₂=CHCH₂), 81.2 (1C, C(CH₃)₃), 43.3 (1C, CH₂NH), 42.6 (1C, CH₂C=O), 35.9 (1C, CH₂=CHCH₂CH₂), 29.6 (1CH₂, CH₂=CHCH₂CH₂) ppm;

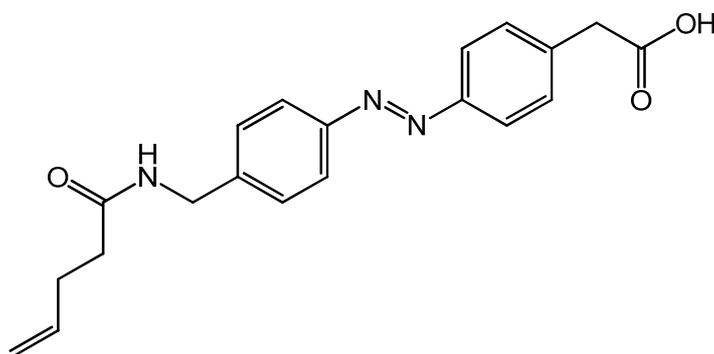
ESI-MS: $m/z = 408.229$ [M+H]⁺;

HREI-MS: $m/z = 407.2197$ [M]⁺ (M = 407.2209, ber. für C₂₄H₂₉N₃O₃);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3277$ (m), 2979 (w), 1725 (m), 1634 (s), 1539 (m), 1138 (m), 876 (w), 835 (m) cm⁻¹;

Elementaranalyse: C₂₄H₂₉N₃O₃, ber. C 70.74, H 7.17, N 10.31, gef. C 70.46, H 7.19, N 10.25 %.

2-(Phenyl-{4'-azo[4'']-(pent-4-enamidomethyl)phenyl})essigsäure (47)



2-(Phenyl-{4'-azo-[4'']-(pent-4-enamidomethyl)phenyl})-essigsäure-*tert*-butylester (46, 80.0 mg, 196 μmol) wurde in Dichlormethan (15 mL) gelöst. Dann wurde Trifluoressigsäure (4 mL) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 5 h bei Raumtemp. gerührt. Zu dem Rückstand wurde dest. Wasser (30 mL) gegeben, die Phasen wurden getrennt und die org.

Phase zweimal mit dest. Wasser (je 20 mL) gewaschen. Die org. Phase wurde anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Trockenmittel abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt (Ethylacetat, Methanol, 6:1). Es wurde anschließend aus Ethylacetat umkristallisiert und das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 66.0 mg (188 μ mol, 96 %, C₂₀H₂₁N₃O₃, M = 351.40 g/mol);

DC (Ethylacetat, Methanol, 6:1): $R_f = 0.64$;

Smp.: 177 °C;

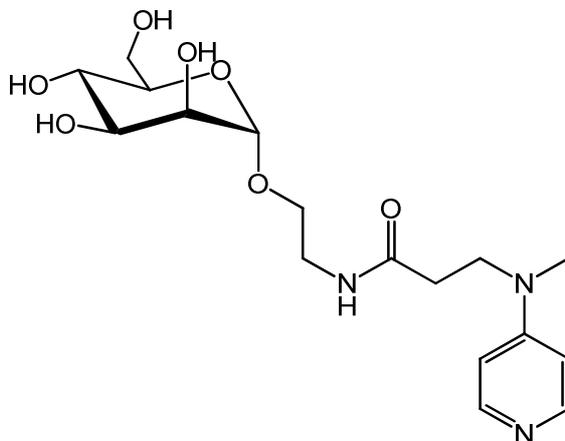
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): $\delta = 8.46$ (t, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, NH), 7.86-7.81 (m, 4H, CH_{arom}-3',5',2'',6''), 7.50-7.43 (m, 4H, CH_{arom}-2',6',3'',5'') 5.87-5.77 (m, 1H, CH=CH₂), 5.08-5.02 (m, 1H, CH=CHH), 5.00-4.96 (m, 1H, CH=CHH), 4.36 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂NH), 3.68 (s, 2H, CH₂C=O), 2.33-2.24 (m, 4H, CH₂CH₂CH=CH₂) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): $\delta = 172.3$ (1C, NHC=O), 171.7 (1C, COOH), 162.4 (1C, C_{arom}-1'), 151.2 (1C, C_{arom}-1''), 143.8 (1C, C_{arom}-4''), 138.2 (1C, C_{arom}-4'), 131.0 (2C, CH_{arom}-3'',5''), 128.6 (2C, CH_{arom}-2',6'), 123.0, 122.9 (4C, CH_{arom}-3',5',2'',6''), 115.6 (1C, CH=CH₂), 42.2 (1C, CH₂NH), 41.1 (1C, CH₂COOH), 35.0 (1C, CH₂CH₂CH=CH₂), 29.7 (CH₂CH₂CH=CH₂) ppm;

MALDI-MS: $m/z = 352.415$ [M+H]⁺;

HREI-MS: $m/z = 351.1591$ [M]⁺ (M = 351.1583, ber. für C₂₀H₂₁N₃O₃);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3260$ (s), 2076 (w), 1635 (s), 1538 (m), 847 (m) cm⁻¹.

3-(Methyl-4'-pyridylamino)-propansäure-(4''-(α -D-mannopyranosyloxy))-ethylamid (50)

Aminoethyl- α -D-mannopyranosid (**48**, 142 mg, 635 μ mol) wurde zusammen mit 3-(Methyl-4'-pyridylamino)propansäure (**58**, 104 mg, 577 μ mol) und HATU (263 mg, 692 μ mol) für 1 h i. Vak. getrocknet. Anschließend wurden die Feststoffe in abs. DMF (6 mL) gelöst und DIPEA (120 μ L, 692 μ mol) hinzugegeben. Es wurde 12 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Chloroform, Methanol, 1:1) und an RP-18-Phase (Wasser) gereinigt. Es wurde ein farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 83.0 mg (215 μ mol, 37 %, M = 385.41 g/mol, C₁₇H₂₇N₃O₇);

DC (Chloroform, Methanol, 1:1): R_f = 0.17;

Smp.: 185 °C;

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 8.07 (d, 3J = 4.9 Hz, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-3,5}}$), 6.70-6.66 (m, 2H, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-2,6}}$), 4.72 (d, $^3J_{1,2}$ = 1.8 Hz, 1H, $\underline{\text{H-1}}$), 3.83 (dd, $^3J_{6,5}$ = 2.3 Hz, $^2J_{6,6'}$ = 11.7 Hz, 1H, $\underline{\text{H-6}}$), 3.78 (dd, $^3J_{2,1}$ = 1.8 Hz, $^3J_{2,3}$ = 3.4 Hz, 1H, $\underline{\text{H-2}}$), 3.77-3.65 (m, 4H, $\underline{\text{H-3}}$, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_2}\underline{\text{C}}_{\text{H}_2}\underline{\text{NMe}}$, $\underline{\text{OCHHCH}_2}\underline{\text{NH}}$), 3.68 (dd, $^3J_{6',5}$ = 6.0 Hz, $^2J_{6',6}$ = 11.7 Hz, 1H, H-6'), 3.59 (dd~t, $^3J_{4,3}$ = $^3J_{4,5}$ = 9.5 Hz, 1H, $\underline{\text{H-4}}$), 3.54-3.45 (m, 2H, $\underline{\text{H-5}}$, $\underline{\text{OCHHCH}_2}\underline{\text{NH}}$), 3.41 (ddd, 3J = 4.3 Hz, 3J = 6.4 Hz, 2J = 14.2 Hz, 1H, $\underline{\text{OCH}_2}\underline{\text{CHHHNH}}$), 3.35-3.29 (m, 1H, $\underline{\text{OCH}_2}\underline{\text{CHHHNH}}$), 3.01 (s, 3H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_3}$), 2.51-2.46 (m, 1H, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_2}\underline{\text{C}}_{\text{H}_2}\underline{\text{NMe}}$) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 173.9 (1C, $\underline{\text{C}}=\underline{\text{O}}$), 155.3 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-1'}}$), 149.6 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-3',5'}}$), 108.1 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-2',6'}}$), 101.7 (1C, $\underline{\text{C-1}}$), 74.8 (1C, $\underline{\text{C-5}}$), 72.5 (1C, $\underline{\text{C-3}}$), 72.1

(1C, C-2), 68.7 (1C, C-4), 67.2 (1C, OCH₂CH₂NH), 63.0 (1C, C-6), 48.8 (1C, CH₂CH₂NMe), 40.4 (1C, OCH₂CH₂NH), 37.8 (1C, Me), 34.4 (1C, CH₂CH₂NMe) ppm;

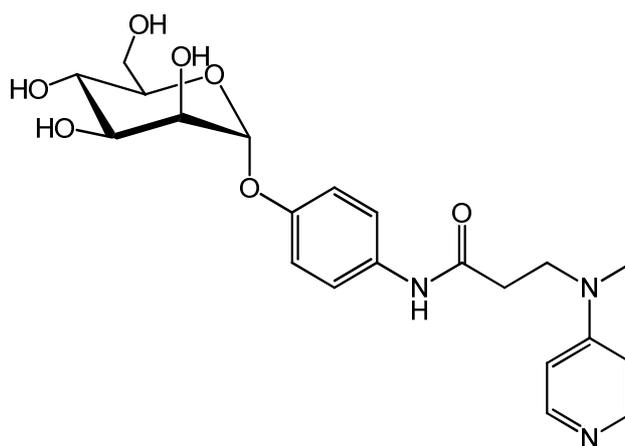
MALDI-MS: $m/z = 386.05 [M+H]^+$, 408.04 $[M+Na]^+$;

ESI-MS: $m/z = 386.5 [M+H]^+$;

HRESI-MS: $m/z = 386.19214 [M+H]^+$ (M = 386.19218, ber. für C₁₇H₂₇N₃O₇ + H);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3252$ (m), 1648 (s), 1606 (s), 1555 (s), 1536 (s), 1222 (s), 1096 (s), 1065 (s), 998 (s), 803 (s), 678 (s) cm⁻¹.

**3-(Methyl-4'-pyridylamino)-propansäure-(4''-(α -D-mannopyranosyloxy))-phenylamid
(51)**



p-Aminophenylmannosid (**19**, 209 mg, 769 μ mol), 3-(Methyl-4-pyridylamino)propansäure (**58**, 126 mg, 699 μ mol) und HATU (263 mg, 692 μ mol) wurden zusammen i.Vak. für 1 h getrocknet. Anschließend wurden die Feststoffe in abs. DMF (5 mL) gelöst, DIPEA (140 μ L, 839 μ mol) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch unter Stickstoffatmosphäre 15 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Chloroform, Methanol, 1:1) und an RP-18-Phase (Wasser, Acetonitril) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 156 mg (360 μ mol, 52 %, M = 433.46 g/mol, C₂₁H₂₇N₃O₇);

DC (Chloroform, Methanol, 1:1): $R_f = 0.16$;

Smp.: 85 °C;

Drehwert: $[\alpha]_D = +85.4$ (T = 21 °C, c = 1.0, MeOH);

¹H-NMR (600 MHz, MeOH-d₄, 300 K): $\delta = 8.06$ (d, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_{\text{arom-3'}}$, 5'), 7.40 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_{\text{arom-3''}}$, 5''), 7.06 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_{\text{arom-2'}}$, 6'), 6.71 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_{\text{arom-2''}}$, 6''), 5.42 (d~br.s, 1H, $\underline{\text{H}}-1$), 3.99 (dd, $^3J_{2,1} = 1.8$ Hz, $^3J_{2,3} = 3.3$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}-2$), 3.88 (dd, $^3J_{3,2} = 3.3$ Hz, $^3J_{3,4} = 9.4$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}-3$), 3.82 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-2$), 3.76 (dd, $^3J_{5,6} = 2.4$ Hz, $^2J_{6,6'} = 12.0$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}-6$), 3.76-3.69 (m, 2H, H-4, H-6'), 3.60 (ddd, $^3J_{5,6a} = 2.4$ Hz, $^3J_{5,6'} = 5.3$ Hz, $^3J_{5,4} = 9.7$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}-5$), 3.04 (s, 3H, $\underline{\text{N}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 2.63 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-3$) ppm;

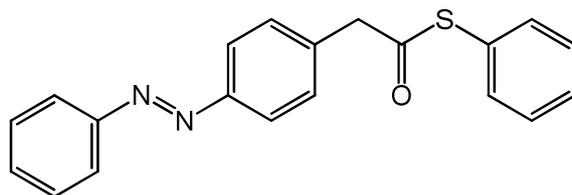
¹³C-NMR (151 MHz, MeOH-d₄, 300 K): $\delta = 171.9$ (1C, $\underline{\text{C}}=\underline{\text{O}}$), 155.3 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-1'}}$), 154.6 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-4'}}$), 149.5 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-3'}}$, 5'), 134.2 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-1''}}$), 122.9 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-2''}}$, 6''), 118.1 (2C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-3''}}$, 5''), 108.1 ($\underline{\text{C}}_{\text{arom-2'}}$, 6'), 100.5 (1C, $\underline{\text{C}}-1$), 75.3 (1C, $\underline{\text{C}}-5$), 72.4 (1C, $\underline{\text{C}}-3$), 72.0 (1C, $\underline{\text{C}}-2$), 68.3 (1C, $\underline{\text{C}}-4$), 62.6 (1C, $\underline{\text{C}}-6$), 48.6 (1C, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-2$), 37.9 (1C, $\underline{\text{N}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_3$), 35.3 (1C, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-3$) ppm;

MALDI-MS: $m/z = 434.097$ [M+H]⁺;

ESI-MS: $m/z = 434.5$ [M+H]⁺;

HRESI-MS: $m/z = 434.19225$ [M+H]⁺ (M = 434.19218, ber. für C₂₁H₂₇N₃O₇ + H);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3247$ (w), 2922 (w), 1603 (m), 1507 (m), 1222 (m), 1104 (s), 1066 (s), 998 (s), 804 (s), 661 (m) cm⁻¹.

S-Phenyl-2-(Phenyl-(4'-azophenyl))essigsäure-thioester (52)

2-Phenyl-(4'-azophenyl)essigsäure (**62**, 108 mg, 450 μmol) wurde zusammen mit HATU (309 mg, 812 μmol) 45 min i. Vak. getrocknet. Anschließend wurden die Feststoffe in abs. DMF (10 mL) gelöst und mit Thiophenol (**63**, 56.0 μL , 547 μmol) und DIPEA (120 μL , 689 μmol) versetzt. Anschließend wurde 14 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan, Ethylacetat, 3:1). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 62.6 mg (188 μmol , 42 %, $M = 332.42 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{OS}$);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 3:1): $R_f = 0.78$;

Smp.: 95 °C;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = 7.95\text{-}7.91$ (m, 4 H, $\text{CH}_{\text{arom-}3',5',2'',6''}$), 7.55-7.47 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{arom-}2',6',3'',5'',4''}$), 7.42-7.39 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{arom-}2''',6''',3''',5''',4'''}_{\text{SPhe}}$), 4.01 (s, 2H, CH_2) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 , 300 K, TMS): $\delta = 194.8$ (1C, $\text{C}=\text{O}$), 152.7 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}1''}$), 152.0 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}4''}$), 136.2 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}1''}$), 134.4 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}2''',6'''}_{\text{SPhe}}$), 131.1 (1C, $\text{CH}_{\text{arom-}4''}$), 130.4 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}2',6'}$), 129.5 (1C, $\text{CH}_{\text{arom-}4'''}_{\text{SPhe}}$), 129.2 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}3''',5'''}_{\text{SPhe}}$), 129.1 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}3'',5''}$), 127.6 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}1'''}_{\text{SPhe}}$), 123.2, 122.9, (4C, $\text{CH}_{\text{arom-}3',5',2'',6''}$), 49.9 (1C, CH_2) ppm;

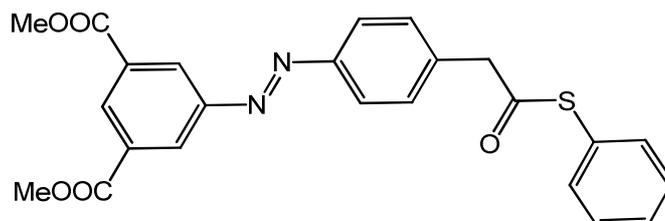
ESI-MS: $m/z = 333.103$ $[\text{M}+\text{H}]^+$;

HREI-MS: $m/z = 332.0984$ $[\text{M}]^+$ ($M = 332.0983$, ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{OS}$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3057$ (w), 2920 (w), 1700 (s), 1581 (w), 1475 (m), 1439 (m), 1289 (m), 1179 (m), 1104 (m), 1067 (m), 1007 (s), 998 (s), 857 (m), 834 (m), 796 (s), 773 (s), 740 (s), 684 (s) cm^{-1} ;

Elementaranalyse: C₂₀H₁₆N₂O₅, ber. C 72.26, H 4.85, N 8.43, S 9.65, gef. C 71.67, H 5.13, N 8.25 S 9.12 %.

2-Phenyl-(4'-azo-(3'',5''-isophthalat)essigsäure-thiophenylester (53)



2-Phenyl-(4'-azo-(3'',5''-isophthalat)essigsäure (**66**, 70.0 mg, 196 μ mol) wurde in Diethylether (15 mL) suspendiert und durch Zugabe von 3 Tropfen DMF gelöst. Anschließend wurde Oxalylchlorid (9.00 μ L, 98.0 μ mol) zugetropft und 30 min bei Raumtemp. gerührt. Zu der Lösung wurde Thiophenol (**63**, 24.0 μ L, 196 μ mol) gegeben und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wurde dest. Wasser (15 mL) zu der Reaktionslösung gegeben, die Phasen getrennt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan, Ethylacetat, 3:1). Es wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 10.0 mg (22.0 μ mol, 11 %, M = 448.49 g/mol, C₂₄H₂₀N₂O₅S);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 2:1): R_f = 0.48;

Smp.: 96-102 °C;

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 8.79 (t, 3J = 1.7 Hz, 1H, CH_{arom-4''}), 8.74 (d, 3J = 1.7 Hz, 2H, CH_{arom-2''},6''), 7.99-7.95 (m, 2H, CH_{arom-3'},5'), 7.53-7.50 (m, 2H, CH_{arom-2'},6'), 7.42-7.37 (m, 5H, CH_{SPh}), 4.02 (s, 2H, CH₂), 4.00 (s, 6H, 2x COOCH₃) ppm;

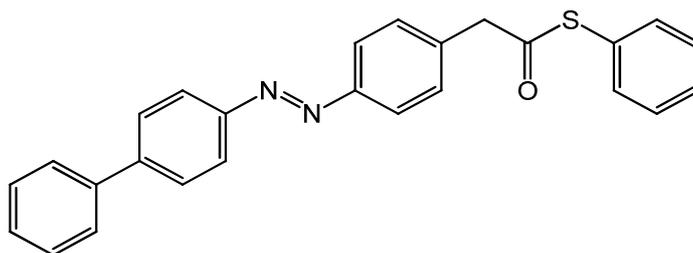
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 194.7 (1C, SC=O), 165.8 (2C, 2x COOCH₃), 152.8 (1C, C_{arom-1''}), 151.6 (1C, C_{arom-4'}), 137.2 (1C, C_{arom-1'}), 134.5 (2C, CH_{arom-SPh-2,6}), 132.3 (1C, CH_{arom-4''}), 131.8 (2C, C_{arom-3''},5''), 130.6 (2C, CH_{arom-2''},6''), 129.6, 129.3 (3C, CH_{arom-SPh-3,4,5}), 127.8 (2C, CH_{arom-2''},6''), 123.6 (2C, CH_{arom-3'},5'), 52.6 (2C, (COOMe)₂), 49.9 (1C, CH₂) ppm;

MALDI-MS: m/z = 449.08 [M+Na]⁺;

HREI-MS: $m/z = 448.1082$ $[M]^+$ ($M = 448.1093$, ber. für $C_{24}H_{20}N_2O_5S$).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3035$ (w), 1722 (s), 1697 (s), 1441 (m), 1241 (s), 987 (s), 755 (s), 744 (s), 688 (m) cm^{-1} .

2-Phenyl-(4'-azo-biphenyl)essigsäure-thiophenylester (54)



2-Phenyl-(4'-azo-biphenyl)essigsäure (**71**, 25.0 mg, 79.0 μ mol) wurde zusammen mit HATU (36.1 mg, 95.0 μ mol) für 1 h i. Vak. getrocknet und anschließend unter Stickstoffatmosphäre in abs. DMF (5 mL) gelöst. Danach wurden Thiophenol (**63**, 16.0 μ L, 158 μ mol) und DIPEA (16.0 μ L, 95.0 μ mol) hinzugegeben und 8 h bei Raumtemp. gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan, Ethylacetat, 20:1 \rightarrow 6:1). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 9.00 mg (22.0 μ mol, 28 %, $M = 408.51$ g/mol, $C_{26}H_{20}N_2OS$);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 8:1), $R_f = 0.82$;

Smp.: 144 $^{\circ}C$;

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 8.02$ -7.98 (m, 2H, $CH_{arom-2'',6''}$), 7.95-7.91 (m, 2H, $CH_{arom-3',5'}$), 7.77-7.74 (m, 2H, $CH_{arom-3'',5''}$), 7.68-7.65 (m, 2H, $CH_{arom-2''',6''}$), 7.51-7.45 (m, 4H, $CH_{arom-2',6', 3''',5''}$), 7.42-7.37 (m, 6H, $CH_{arom-2''',6''',3''',5''',4''''_{SPh}, CH_{arom-4''}$), 4.00 (s, 2H, CH_2) ppm;

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 194.8$ (1C, $C=O$), 151.6 (1C, $C_{arom-1''}$), 151.2 (1C, $C_{arom-4'}$), 143.4 (1C, $C_{arom-4''}$), 136.2 (1C, $C_{arom-1'}$), 134.5 (2C, $CH_{arom-2''',6''''_{SPh}}$), 130.4 (2C, $CH_{arom-2',6'}$), 129.5 (1C, $CH_{arom-4''''_{SPh}}$), 129.2 (2C, $CH_{arom-3''',5''''_{SPh}}$), 128.9 (2C, $CH_{arom-3''',5''}$), 127.9 (1C, $CH_{arom-4''}$), 127.8 (2C, $CH_{arom-3'',5''}$), 127.6 (1C, $C_{arom-1''}$).

1''''_{SPh}), 127.2 (2C, CH_{arom-2''',6'''}), 123.4 (2C, CH_{arom-2'',6''}), 123.2 (2C, CH_{arom-3',5'}), 49.9 (1C, CH₂) ppm;

HREI-MS: $m/z = 408.128$ [M]⁺ (M = 408.129, ber. für C₂₆H₂₀N₂OS);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2920$ (w), 2851 (w), 1699 (m), 1477 (w), 1233 (w), 985 (s), 865 (w), 846 (m), 766 (s), 747 (s), 687 (s) cm⁻¹.

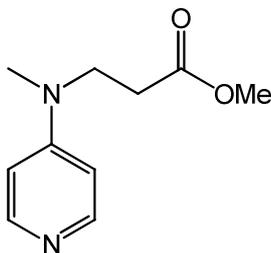
***N,N,N*-Trimethyl-2-oxo-2-(4-{4-[2-oxo-2-(phenylthio)ethyl]phenyldiazenyl}benzyl-amino)ethanaminium-trifluoracetat (55)**



2-Phenyl-(4'-azo(4''-(2-trimethylammoniummethylamido)benzyl)-essigsäure-*O*-*tert*-butylester (74, 130 mg, 352 μ mol) wurde in dest. Wasser (8 mL) suspendiert. Anschließend wurde Trifluoressigsäure (2 mL) hinzugegeben und das Gemisch für 1 h bei Raumtemp. gerührt. Der Rückstand wurde erst lyophilisiert und dann zusammen mit HATU (70.7 mg, 186 μ mol) für 1 h i. Vak. getrocknet. Die Feststoffe wurden in abs. DMF (6 mL) gelöst und mit Thiophenol (63, 72.0 μ L, 704 μ mol) und DIPEA (74.0 μ L, 422 μ mol) versetzt. Die Lösung wurde 5 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Phase gereinigt (Gradient: Acetonitril→Wasser, 95 %→ 10 % Acetonitril inkl. 0.1 % Ameisensäure). Das Produkt wurde massenspektrometrisch nachgewiesen, konnte aber nicht isoliert werden.

DC (Dichlormethan, Methanol, 7:1): $R_f = 0.42$;

MALDI-MS: $m/z = 575.76$ [M]⁺.

3-[Methyl-(pyridin-4-yl)amino]propansäuremethylester (57)^[102]

Eine Lösung aus 4-(Methylamino)pyridin (**56**, 760 mg, 7.03 mmol) und frisch destilliertem Methylacrylat (12 mL) wurde 20 h unter Rückfluss erhitzt. Überschüssiges Methylacrylat wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan, Methanol, 20:1). Das Produkt wurde als orangefarbenes Öl erhalten.

Ausbeute: 1.22 g (6.28 mmol, 89 %, C₁₀H₁₄N₂O₂, M = 194.23 g/mol) (Lit.^[102]: 42 %);

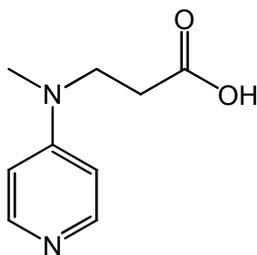
DC (Dichlormethan, Methanol, 10:1): *R_f* = 0.2;

¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 8.10 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 2H, CH_{arom-3,5}), 6.69 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 2H, CH_{arom-2,6}), 3.77 (t, ³*J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂₋₂), 3.68 (s, 3H, COOCH₃), 3.38 (s, 3H, NCH₃), 2.65 (t, ³*J* = 6.9 Hz, CH₂₋₃) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 173.8 (1C, C=O), 155.2 (1C, C_{arom-1}), 149.6 (2C, CH_{arom-3,5}), 108.0 (2C, CH_{arom-2,6}), 52.3 (1C, OCH₃), 48.1 (1C, CH₂₋₂), 37.7 (1C, NCH₃), 32.4 (1C, CH₂₋₃) ppm;

ESI-MS: *m/z* = 195.11 [M+H]⁺;

IR (AT-IR): $\tilde{\nu}$ = 3312 (w), 2948 (w), 1729 (m), 1644 (w), 1596 (s), 1436 (m), 1254 (w), 1229 (m), 1174 (m), 1109 (m), 998 (s), 804 (s) cm⁻¹.

3-(Methyl-(pyridin-4-yl)amino)propansäure (58)^[102]

3-[Methyl-(pyridin-4-yl)amino]propansäuremethylester (**57**, 1.02 g, 5.25 mmol) wurde in einer Mischung aus Methanol und dest. Wasser (1:1, 30 mL) gelöst, mit Natriumhydroxid (420 mg, 10.5 mmol) versetzt und 45 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Lösung abgekühlt und mit konz. Salzsäure vorsichtig neutralisiert. Das Rohprodukt wurde i. Vak. eingengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Chloroform, Methanol, 1:1). Das Produkt wurde anschließend aus wenig Ethanol kristallisiert und als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 815 mg (4.52 mmol, 86 %, M = 180.23 g/mol, C₉H₁₂N₂O₂) (Lit.^[102]: 42 %);

DC (Chloroform, Methanol, 1:1): $R_f = 0.1$;

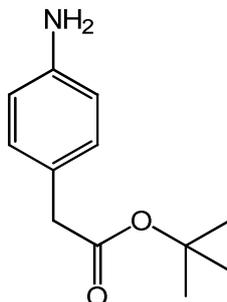
Smp.: 178-182 °C;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 300 K): $\delta = 7.96$ (br. s, 2H, CH_{arom-3,5}), 6.79 (d, ³J = 6.8 Hz, 2H, CH_{arom-2,6}), 3.72 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂₋₃), 3.06 (s, 3H, NCH₃), 2.43 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, CH₂₋₂) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 300 K): $\delta = 180.2$ (1C, C=O), 156.2 (1C, C_{arom-1}), 141.3 (2C, CH_{arom-3,5}), 106.9 (2C, CH_{arom-2,6}), 49.0 (1C, CH₂₋₂), 37.5 (1C, NCH₃), 34.6 (1C, CH₂₋₃) ppm;

ESI-MS: $m/z = 181.10$ [M + H]⁺, 203.08 [M + Na]⁺;

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3459$ (m), 2818 (m), 1646 (s), 1553 (s), 1403 (m), 1222 (m), 808 (s) cm⁻¹.

2-(4-Aminophenyl)essigsäure-*tert*-butylester (59)^[117]

4-Nitrophenylessigsäure-*tert*-butylester (**41**, 102 mg, 430 μ mol) wurde in einer 2:1 Mischung aus Ethanol/Dioxan (30 mL) gelöst. Dann wurde eine Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle hinzugegeben und Wasserstoff über eine Kanüle durch die Lösung geleitet. Nach 4.5 h Reaktionszeit bei Raumtemp. wurde der Katalysator über einen Spritzenfilter abgetrennt und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wurde als leicht rötliches Öl erhalten.

Ausbeute: 87.4 mg (422 μ mol, 98 %, $M = 207.27$ g/mol, $C_{12}H_{17}NO_2$);

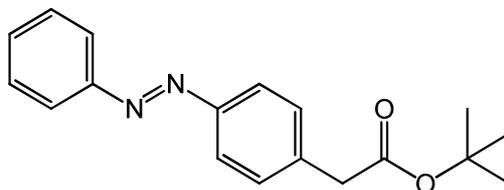
DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 5:1): $R_f = 0.12$;

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 7.03$ - 6.93 (m, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-3,5}}$), 6.61 - 6.52 (m, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-2,6}}$), 3.33 (s, 2H, $\underline{CH_2}$), 1.35 (s, 9 H, $C(\underline{CH_3})_3$) ppm;

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 171.6$ (1C, $\underline{C=O}$), 145.1 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-1}}$), 130.0 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-2,6}}$), 124.7 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-4}}$), 115.2 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-3,5}}$), 80.5 (1C, $\underline{C}(\underline{CH_3})_3$), 41.8 (1C, $\underline{CH_2}$), 28.1 (3C, $C(\underline{CH_3})_3$) ppm;

HREI-MS: $m/z = 207.1258$ $[M]^+$ ($M = 207.1259$, ber. für $C_{12}H_{17}NO_2$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3448$ (w), 3368 (m), 2976 (m), 2931 (w), 1718 (s), 1625 (s), 1516 (s), 1337 (w), 847 (m) cm^{-1} .

2-Phenyl-(4'-azophenyl)essigsäure-*tert*-butylester (61)

4-Aminophenylacetic acid *tert*-butyl ester (**59**, 1.64 g, 7.93 mmol) and Nitrosobenzene (**60**, 850 mg, 7.93 mmol) were dissolved in acetic acid (80 mL). The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The solvent was removed in vacuo and the crude product was purified by column chromatography (Cyclohexane, Ethyl acetate, 3:1). A red solid was obtained.

Yield: 1.81 g (6.10 mmol, 77 %, $M = 296.36$ g/mol, $C_{18}H_{20}N_2O_2$);

DC (Cyclohexane, Ethyl acetate, 3:1): $R_f = 0.70$;

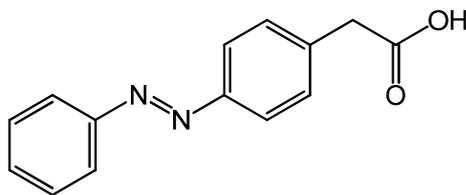
Mp.: 55-56 °C;

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$, 300 K): $\delta = 7.85$ (m, 2H, $CH_{arom-2'',6''}$), 7.82 (m, 2H, $CH_{arom-3',5'}$), 7.47-7.40 (m, 3H, $CH_{arom-3'',5'',4''}$), 7.37 (m, 2H, $CH_{arom-2',6'}$), 3.55 (s, 2H, CH_2), 1.39 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm;

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, 300 K, TMS): $\delta = 170.4$ (1C, $C=O$), 151.7 (1C, $C_{arom-1''}$), 151.6 (1C, $C_{arom-4'}$), 137.9 (1C, $C_{arom-1'}$), 130.9 (1C, $CH_{arom-4''}$), 130.0 (2C, $CH_{arom-2',6'}$), 129.1 (2C, $CH_{arom-3'',5''}$), 123.0, 122.8 (4C, $CH_{arom-3',5',2'',6''}$), 81.1 (1C, $C(CH_3)_3$), 42.6 (1C, CH_2), 28.0 (3C, $C(CH_3)_3$) ppm;

HREI-MS: $m/z = 296.1528$ [M]⁺ ($M = 296.1525$, ber. für $C_{18}H_{20}N_2O_2$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3070$ (w), 2977 (m), 2930 (w), 1706 (s), 1601 (m), 1367 (m), 1273 (s), 1140 (s), 838 (s), 765 (s), 688 (s) cm^{-1} .

2-Phenyl-(4'-azophenyl)essigsäure (62)

2-Phenyl-(4'-azophenyl)essigsäure-*tert*-butylester (**61**, 320 mg, 1.08 mmol) wurde in Dichlormethan (12 mL) gelöst, mit Trifluoressigsäure (5 mL) versetzt und bei Raumtemp. gerührt. Nach 4 h Reaktionszeit wurde dest. Wasser (15 mL) hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die org. Phase wurde dreimal mit dest. Wasser (je 15 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert, das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan, Ethylacetat, 3:1→Ethylacetat). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 251 mg (1.04 mmol, 96 %, M = 240.26 g/mol, C₁₄H₁₂N₂O₂);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 3:1): $R_f = 0.1$;

Smp.: 190 °C (Lit.^[107]: 196-197 °C);

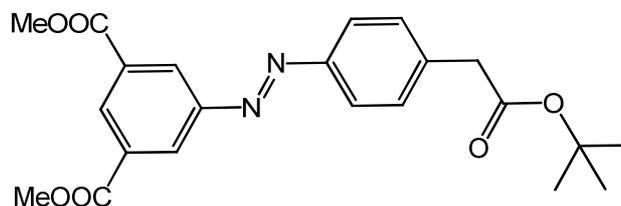
¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, 300 K): $\delta = 7.81-7.75$ (m, 4H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-3',5',2'',6''}}$), $7.46-7.35$ (m, 5H, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-2',6',3'',4'',5''}}$), 3.61 (s, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 300 K): $\delta = 175.0$ (1C, $\underline{\text{C}}=\text{O}$), 154.0 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-1''}}$), 152.9 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-4'}}$), 139.7 (1C, $\underline{\text{C}}_{\text{arom-1'}}$), 132.2 (1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-4''}}$), 131.4 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-2',6'}}$), 130.3 (2C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-3'',5''}}$), 123.9 , 123.8 (4C, $\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{arom-3',5',2'',6''}}$), 41.7 (1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$) ppm;

ESI-MS: $m/z = 241.097$ [M+H]⁺;

HREI-MS: $m/z = 240.0898$ [M]⁺ (M = 240.0899, ber. für C₁₄H₁₂N₂O₂);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2914$ (w), 1690 (s), 1409 (m), 901 (m), 862 (m), 763 (m), 683 (s) cm⁻¹.

2-Phenyl-(4'-azo-(3'',5''-isophthalat)essigsäure-*tert*-butylester (65)

4-Nitrophenylessigsäure-*tert*-butylester (**41**, 2.00 g, 8.43 mmol) wurde nach der AAV1 zur Nitrosoverbindung **42** reduziert. Anschließend wurde diese in Eisessig (80 mL) gelöst und zu einer Suspension aus Dimethyl-5-aminoisophthalat (**64**, 1.35 g, 6.48 mmol) in Eisessig (80 mL) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 48 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan → Cyclohexan, Ethylacetat, 8:1). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 676 mg (1.64 mmol, 25 %, C₂₂H₂₄N₂O₆, M = 412.44 g/mol);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 5:1): R_f = 0.42;

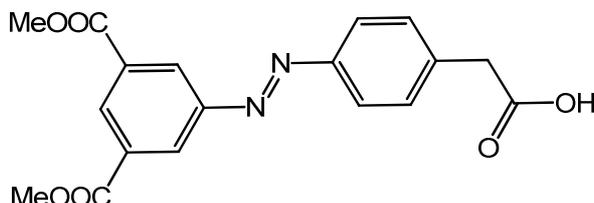
Smp.: 86-90 °C;

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 8.78 (t, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, CH_{arom}-4''), 8.73 (d, ⁴J = 1.6 Hz, 2H, CH_{arom}-2'',6''), 7.95-7.92 (m, 2H, CH_{arom}-3',5'), 7.45 (m, 2H, CH_{arom}-2',6'), 4.00 (s, 6H, 2x COOCH₃), 3.63 (s, 2H, CH₂), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 170.2 (1C, COOC(CH₃)₃), 165.8 (2C, 2x COOCH₃), 152.8 (1C, C_{arom}-1''), 151.3 (1C, C_{arom}-4'), 138.9 (1C, C_{arom}-1'), 132.2 (2C, C_{arom}-3'',5''), 131.7 (1C, CH_{arom}-4''), 130.1 (2C, CH_{arom}-2',6'), 127.8 (2C, CH_{arom}-2'',6''), 123.4 (2C, CH_{arom}-3',5'), 81.3 (1C, C(CH₃)₃), 52.6 (2C, 2x COOCH₃), 42.6 (1C, CH₂), 28.0 (1C, C(CH₃)₃) ppm;

HREI-MS: m/z = 412.1630 [M]⁺ (M = 412.1634, ber. für C₂₂H₂₄N₂O₆);

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2954 (w), 1722 (s), 1603 (w), 1503 (w), 1430 (m), 1368 (m), 1329 (m), 1240 (s), 1137 (s), 999 (m), 916 (w), 872 (w), 815 (w), 754 (s), 670 (m) cm⁻¹.

2-Phenyl-(4'-azo-(3'',5''-isophthalat)essigsäure (66)

2-Phenyl-(4'-azo-(3'',5''-isophthalat)essigsäure-*tert*-butylester (**65**, 157 mg, 381 μ mol) wurde in Dichlormethan (5 mL) gelöst und mit Trifluoressigsäure (3 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemp. gerührt und der Umsatz der Reaktion per DC-Kontrolle verfolgt (Cyclohexan, Ethylacetat, 5:1). Nach beendeter Reaktion (3 h) wurde der Rückstand dreimal mit dest. Wasser (je 30 mL) gewaschen, die org. Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Trockenmittel abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan, Ethylacetat, 5:1 \rightarrow Ethylacetat). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 95.0 mg (267 μ mol, 70 %, $M = 356.33$ g/mol, $C_{18}H_{16}N_2O_6$);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 5:1): $R_f = 0.12$;

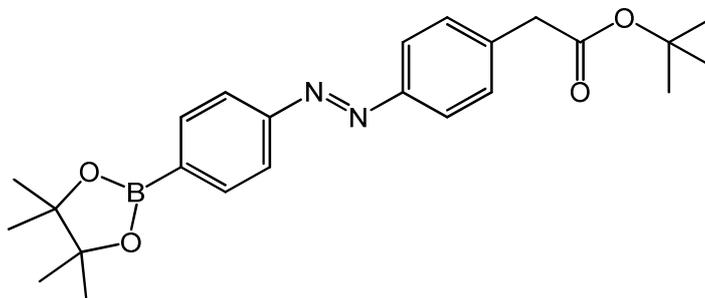
Smp.: 156 °C;

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): $\delta = 8.45$ (t, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, $\underline{CH}_{\text{arom-4''}}$), 8.42 (d, $^4J = 1.6$ Hz, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-2''},6''}$), 7.88-7.85 (m, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-3''},5''}$), 7.51-7.48 (m, 2H, $\underline{CH}_{\text{arom-2',6'}}$), 3.90 (s, 6H, 2x $\underline{COOCH_3}$), 3.71 (s, 2H, $\underline{CH_2}$) ppm;

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , 300 K): $\delta = 172.8$ (1C, \underline{COOH}), 165.1 (2C, 2x $\underline{COOCH_3}$), 152.3 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-1''}}$), 150.8 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-4'}}$), 140.6 (1C, $\underline{C}_{\text{arom-1'}}$), 131.9 (2C, $\underline{C}_{\text{arom-3''},5''}$), 131.6 (1C, $\underline{CH}_{\text{arom-4''}}$), 131.1 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-2',6'}}$), 127.1 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-2''},6''}$), 123.4 (2C, $\underline{CH}_{\text{arom-3',5'}}$), 53.2 (2C, 2x $\underline{COOCH_3}$), 41.1 (1C, $\underline{CH_2}$) ppm;

HREI-MS: $m/z = 356.1014$ $[M]^+$ ($M = 356.1008$, ber. für $C_{18}H_{16}N_2O_6$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2955$ (w), 2161 (w), 2040 (w), 1975 (w), 1723 (s), 1430 (m), 1324 (m), 1240 (s), 1168 (m), 860 (m), 815 (m) cm^{-1} .

2-Phenyl-(4'-azo-(4''-boronsäure-pinakolester)phenyl)-essigsäure-*tert*-butyl-ester (68)

4-Nitrophenylessigsäure-*tert*-butylester (**41**, 2.00 g, 8.41 mmol) wurde nach AAV1 zur Nitrosoverbindung **42** reduziert und anschließend in Eisessig (100 mL) gelöst. Diese Lösung wurde zu einer Lösung von 4-Aminophenylboronsäurepinakolester (**67**, 1.00 g, 4.52 mmol) in Eisessig (80 mL) gegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend 48 h bei Raumtemp. gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Toluol, Ethylacetat, 6:1). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.00 g (2.37 mmol, 52 %, M = 422.32 g/mol, C₂₄H₃₁BN₂O₄);

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 9:1): *R_f* = 0.42;

Smp.: 124 °C;

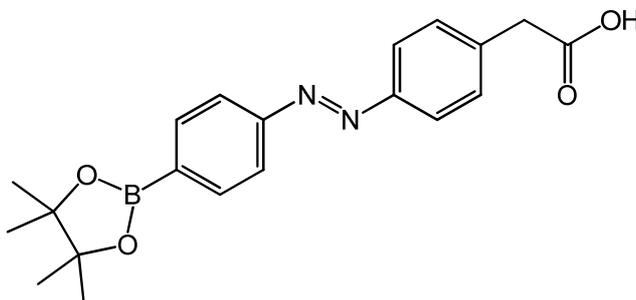
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 7.97-7.94 (m, 2H, CH_{arom}-3'',5''), 7.91-7.87 (m, 4H, CH_{arom}-3',5',2'',6''), 7.44-7.40 (m, 2H, CH_{arom}-2',6'), 3.60 (s, 2H, CH₂), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.37 (s, 12H, B(OC(CH₃)₂)₂) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 170.4 (1C, C=O), 154.4 (1C, C_{arom}-1''), 151.6 (1C, C_{arom}-4'), 138.1 (1C, C_{arom}-1'), 137.8 (1C, C_{arom}-4''), 135.6 (2C, CH_{arom}-3'',5''), 130.0 (2C, CH_{arom}-2',6'), 123.1, 121.9 (4C, CH_{arom}-3',5',2'',6''), 84.0 (2C, COBOC), 81.1 (1C, C(CH₃)₃), 42.6 (1C, CH₂), 28.0 (4C, B(OC(CH₃)₂)₂), 24.9 (3C, C(CH₃)₃) ppm;

¹¹B-NMR (160 MHz, CDCl₃, 300 K, TMS): δ = 30.36 (s) ppm;

HREI-MS: *m/z* = 422.2367 [M]⁺ (M = 422.2377, ber. für C₂₄H₃₁BN₂O₄);

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2981 (w), 1729 (s), 1367 (m), 1225 (m), 1140 (s), 877 (m), 841 (m) cm⁻¹.

2-Phenyl-(4'-azo-(4''-boronsäure-pinakolester)phenyl)-essigsäure (69)

2-Phenyl-(4'-azo-(4''-boronsäure-pinakolester)phenyl)-essigsäure-*tert*-butylester (**68**, 1.00 g, 2.37 mmol) wurde in Dichlormethan (25 mL) gelöst und mit Trifluoressigsäure (2 mL) versetzt. Die Lösung wurde 3 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit dest. Wasser (15 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die org. Phase dreimal mit dest. Wasser (je 15 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan, Ethylacetat, 9:1→Ethylacetat) wurde das Produkt als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 824 mg (2.25 mmol, 95 %, M = 366.22 g/mol, C₂₀H₂₃BN₂O₄);

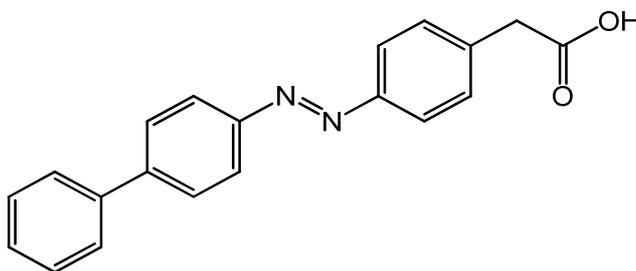
Smp.: 168-170 °C;

DC (Cyclohexan, Ethylacetat, 5:1): $R_f = 0.2$;

¹H-NMR (200 MHz, MeOH-d₄, 300 K): $\delta = 7.85$ - 7.74 (m, 6H, CH_{arom}-3',5',2'',6'',3'',5''), 7.39 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, CH_{arom}-2',6'), 3.62 (s, 2H, CH₂), 1.28 (s, 12H, B(OC(CH₃)₂)₂) ppm;

HREI-MS: $m/z = 366.1744$ (M = 366.1751, ber. für C₂₀H₂₃BN₂O₄);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2982$ (w), 1699 (m), 1601 (m), 1503 (m), 1396 (m), 1359 (s), 1272 (m), 1141 (s), 1087 (s), 1011 (m), 963 (m), 847 (s), 651 (s), 551 (m) cm⁻¹.

2-Phenyl-(4'-azo-biphenyl)essigsäure (71)

2-Phenyl-(4'-azo-(4''-boronsäure-pinakolester)phenyl)-essigsäure (**69**, 121 mg, 330 μmol) wurde in Methanol (10 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander Iodbenzol (**70**, 36.0 μL , 323 μmol), wasserfreies Kaliumcarbonat (138 mg, 999 μmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (3.66 mg, 3.17 μmol) gegeben und 2 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Dichlormethan, Methanol, 10:1). Das Produkt wurde als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 95.0 mg (300 μmol , 91 %, $M = 316.35 \text{ g/mol}$, $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$);

DC (Dichlormethan, Methanol, 10:1), $R_f = 0.42$;

Smp.: 208 °C;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , 300 K, TMS): $\delta = 8.00\text{-}7.96$ (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom-}2'',6''}$), 7.94-7.89 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom-}3',5'}$), 7.89-7.85 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom-}3'',5''}$), 7.80-7.76 (m, 2H, $\text{CH}_{\text{arom-}2''',6'''}$), 7.55-7.47 (m, 4H, $\text{CH}_{\text{arom-}2',6',3''',5'''}$), 7.46-7.41 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{arom-}4''}$), 3.68 (s, 2H, CH_2) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6 , 300 K, TMS): $\delta = 173.0$ (1C, $\text{C}=\text{O}$), 151.6, 151.2 (2C, $\text{C}_{\text{arom-}4',1''}$), 143.4 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}4''}$), 139.7 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}1'''}$), 139.4 (1C, $\text{C}_{\text{arom-}1'}$), 131.0 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}2',6'}$), 129.6 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}3'',5''}$), 128.7 (1C, $\text{CH}_{\text{arom-}4''}$), 128.1 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}2''',6'''}$), 127.5 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}3''',5'''}$), 127.3 (1C, $\text{CH}_{\text{arom-}4''}$), 123.7 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}3',5'}$), 122.9 (2C, $\text{CH}_{\text{arom-}2'',6''}$) 41.3 (1C, CH_2) ppm;

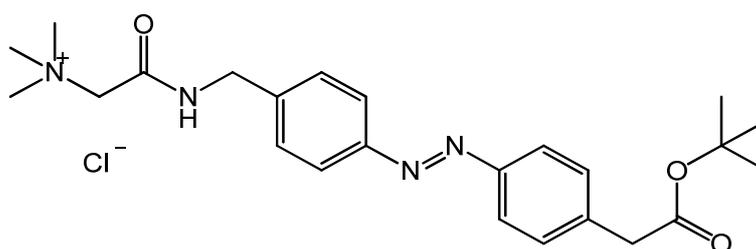
MALDI-MS: $m/z = 317.33$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 342.27 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;

EI-MS: $m/z = 317.11$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 316.11 $[\text{M}]^+$;

HREI-MS: $m/z = 316.1203$ $[M]^+$ ($M = 316.1212$, ber. für $C_{20}H_{16}N_2O_2$);

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2915$ (w), 1733 (m), 1637 (m), 1388 (m), 1256 (m), 895 (w), 845 (s), 809 (w), 762 (s), 687 (s) cm^{-1} .

2-Phenyl-(4'-azo (4''-(2-trimethylammonium-chlorid-ethylamido)benzyl)-essigsäure-*O*-tert-butylester (74)



Ähnlich einer Literaturvorschrift^[118] wurde Betain (**72**, 1.20 g, 10.2 mmol) in Acetonitril (7 mL) suspendiert. Oxalylchlorid (0.887 mL, 10.3 mmol), gelöst in Dichlormethan (4 mL) wurde vorsichtig zugetropft. Anschließend wurden 20 Tropfen DMF hinzugegeben und die Reaktionslösung 15 min bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand in abs. DMF (6 mL) aufgenommen. Diese Lösung wurde vorsichtig zu einer auf 0 °C abgekühlten Lösung von 2-Phenyl-(4'-azo (4''benzylamin))-essigsäure-*tert*-butylester (**44**, 187 mg, 575 μ mol) und DIPEA (197 μ L, 1.16 mmol) in abs. DMF (10 mL) gegeben. Es wurde anschließend 15 min bei 0 °C und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Produkt durch zweimalige Säulenchromatographie (Ethylacetat, Methanol, 4:1 und Dichlormethan, Methanol, 4:1) gereinigt. Es wurde ein orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 202 mg (438 μ mol, 76 %, $M = 461.00$ g/mol, $C_{24}H_{33}N_4O_3^+Cl^-$);

DC (Dichlormethan, Methanol, 4:1): $R_f = 0.48$;

Smp.: 180 °C (Zers.);

¹H-NMR (500 MHz, MeOH- d_4 , 300 K): $\delta = 7.94$ - 7.88 (m, 4H, $CH_{\text{arom-}3',5',2'',6''}$), 7.57 - 7.53 (m, 2H, $CH_{\text{arom-}3'',5''}$), 7.50 - 7.46 (2H, $CH_{\text{arom-}2',6'}$) 4.56 (s, 2H, CH_2NH), 4.26-4.24 (m, 2H, CH_2N^+), 3.61 (s, 2H, $CH_2C=O$), 3.39 (s, 9H, $(CH_3)_3N^+$), 2.60 (s, 9H, $C(CH_3)_3$) ppm;

¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-d₄, 300 K): δ = 172.4 (1C, CH₂C=O), 164.8 (1C, NHC=O), 153.3, 152.9 (2C, C_{arom}-4',1''), 142.5 (1C, C_{arom}-4''), 139.8 (1C, C_{arom}-1'), 131.2 (2C, CH_{arom}-2',6'), 129.7 (2C, CH_{arom}3'',5''), 124.1, 123.9 (4C, CH_{arom}-3',5',2'',6''), 82.3 (1C, C(CH₃)₃), 65.7 (1C, CH₂NMe₃), 54.9 (3C, N(CH₃)₃), 43.8 (1C, CH₂NH), 43.2 (1C, CH₂C=O), 28.3 (3C, C(CH₃)₃) ppm;

MALDI-MS: m/z = 426.487 [M+H]⁺, 425.482 [M]⁺;

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3360 (s), 3028 (m), 2785 (m), 2447 (w), 1728 (m), 1677 (s), 1638 (m), 1470 (m), 1368 (m), 1226 (m), 1142 (s), 931 (w), 839 (m), 755 (m), 578 (s), 524 (s) cm⁻¹.

5.3 Angaben zur Durchführung der theoretischen Arbeiten

5.3.1 Rechnungen mit Sybyl

Alle Rechnungen in Kapitel 3.1 dieser Arbeit wurden mit *Sybyl*^[77] von Tripos Inc. der Version 6.9 unter Linux durchgeführt. Für die Kraftfeldmethoden wurde das Tripos-Kraftfeld verwendet, das auch für die Diazirin-Funktionalität anwendbar ist. Für flexibles Docking kleiner Moleküle wurde *FlexX*^[119-121] in der Version 1.11.1 (implementiert in *Sybyl 6.9*) benutzt. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte ausschließlich mit *Sybyl*. Die verwendete Proteinstruktur wurde von vorherigen Arbeiten^[122-123] übernommen, in denen auch die Modifikation der Kristallstruktur detailliert beschrieben ist.

Zur Bewertung der einzelnen Dockingergebnisse wurde das *Consensus-Scoring-Verfahren*^[124-125] (CScore) verwendet. Dies bietet eine breitere Basis für die Charakterisierung der erhaltenen Konformationen und minimiert die Gefahr von falsch positiven Treffern (*false positives*) bzw. den Verlust von guten Strukturen.

5.3.2 Rechnungen mit der Schrödinger Software

Der Großteil der Rechnungen dieser Arbeit (Kapitel 3.2 und 3.3) wurde unter Verwendung der *Schrödinger Software* durchgeführt. Im Folgenden sind sowohl allgemeine Angaben zur Durchführung als auch einige theoretischen Grundlagen kurz zusammengefasst.

Alle dargestellten Abbildungen der Protein- und Ligandenstrukturen in den Kapiteln 3.2 und 3.3 wurden mit *Maestro*^[23] erstellt, welches im Programmpaket *Schrödinger* enthalten ist.

Kraftfelder

Alle Rechnungen wurden mit dem Kraftfeld OPLS-2005 (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*)^[126-128] durchgeführt, welches auf Proteine spezialisiert ist. Bei Kraftfeld-Modellen dienen sowohl die klassische Molekülmechanik, bei der die Atome als deformierbare Kugeln betrachtet werden, welche durch eine Feder miteinander verbunden sind, sowie auch empirische und ab-initio-Daten als Grundlage. Dabei werden Potentialhyperflächen verwendet, deren potentielle Energie minimiert wird, um eine möglichst günstige Anordnung der Atome im Raum zu erhalten. Die Gesamtenergie der Potentialhyperflächen ergibt sich aus mehreren einzelnen Energiebeiträgen, die in Gleichung 1 zusammengefasst sind:

$$E_{\text{ges}} = E_r + E_\alpha + E_\theta + E_{\text{HBr}} + E_{\text{el}} + E_{\text{vdw}} + \dots \quad (1)$$

Zu der Gesamtenergie tragen kovalente und nicht-bindende Wechselwirkungen bei, die durch die einzelnen Energieterme beschrieben werden. Dabei stehen die Terme für die jeweiligen Energien der Bindungslänge (E_r), Bindungswinkel (E_α), Torsionswinkel (E_θ), Wasserstoffbrückenbindungen (E_{HBr}), elektrostatische Wechselwirkungen (E_{el}) und Van-der-Waals-Wechselwirkungen (E_{vdw}).^[129]

RMSD-Wert

Die Minimierung der Proteinkristallstrukturen erfolgt mit Hilfe des RMSD-Wertes (*Root-mean-square-deviation*). Die Berechnung des Wertes erfolgt nach Gleichung 2. Zwei Konformationen einer Struktur werden durch rotatorische und translatorische Bewegungen möglichst passend aufeinander gelegt.^[130] Anschließend wird die mittlere quadratische Abweichung der Atomkoordinaten berechnet und so die Ähnlichkeit beider Strukturen ermittelt. Der Vorgang wird wiederholt bis der RMSD-Wert minimal ist.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} (\sum_{i=1}^N (x_{i,A} - x_{i,B}^M)^2 + \sum_{i=1}^N (y_{i,A} - y_{i,B}^M)^2 + \sum_{i=1}^N (z_{i,A} - z_{i,B}^M)^2)} \quad (2)$$

In der Gleichung bezeichnen x , y und z die dreidimensionalen Koordinaten der Atome im Raum; A und B sind die beiden unterschiedlichen Konformere und der Index M kennzeichnet das Konformer, das dem anderen Konformer angepasst wurde.^[131]

PRCG-Methode

Für die lokale Optimierungen von Ligandenstrukturen wird im Programm *MacroModel* die *Polak-Ribiere-Conjugate-Gradient* (PRCG)-Methode verwendet. Die Optimierung findet in einer quadratisch angenäherten Funktion mit Hilfe mehrerer *line searches* statt. Die Minimierung erfolgt entlang einer Richtung, die bei den *Conjugate-Gradient*-Methoden von den vorherigen Richtungen abhängig ist. Es folgen so viele Iterationen vom *line search* bis ein Minimum erreicht ist.

Verwendete Kristallstrukturen:

Open gate-Konformation: PDB-Code 1KLF

Closed gate-Konformation: PDB-Code 1UWF

Vorbereitung der Proteinstrukturen:

Die Proteinstrukturen wurden mit *PrepWiz* vorbereitet.

Open gate-Konformation: Die unbearbeitete Struktur mit dem PDB-Code 1KLF beinhaltet acht Monomere des FimH, welche jeweils mit dem FimC komplexiert sind. Die Struktur wurde zunächst auf ein monomeres FimH vereinfacht, indem alle übrigen Strukturen manuell in *Maestro*^[23] aus der *Workspace* gelöscht wurden. Daraufhin folgte eine Optimierung der Proteinstruktur. Zunächst wurden Wasserstoffatome und Disulfidbrücken hinzugefügt und Kristallisationsmoleküle wie Glycerin manuell gelöscht. Außerdem wurden alle Wassermoleküle entfernt, welche einen größeren Abstand als 5 Å zum Protein und somit keinen Einfluss auf die Struktur des FimH oder die Bindung eines Liganden haben. Die Struktur wurde daraufhin auf Fehler untersucht. Strukturfehler in oder in der Nähe der Bindungstasche müssen behoben werden, andere können ggf. vernachlässigt werden. Anschließend wurde mit *PrepWiz* eine Optimierung der Struktur vorgenommen, in der intramolekulare Bindungslängen und -winkel sowie die Orientierung von Wassermolekülen energetisch optimiert wird. Als Letztes erfolgt eine weitere Optimierung der Proteinstruktur mit einem RMSD-Wert von 0.3 Å als Zielwert.

Closed gate-Konformation: Die Kristallstruktur mit dem PDB-Code 1UWF aus der RCSB-Datenbank stellt nur die Lektindomäne des FimH dar, ohne ein komplexiertes FimC. Alle Schritte zur Optimierung der Proteinstruktur wurden analog zur *open gate*-Konformation durchgeführt.

Vorbereitung der Ligandenstrukturen

Alle verwendeten Liganden wurden zunächst mit dem 2D-Sketcher in *Maestro*^[23] gezeichnet, in eine 3D-Struktur umgewandelt und mit *MacroModel*^[90] energieminiert. Anschließend wurden mit *LigPrep*^[91] mehrere Konformationen der Liganden erstellt.

Docking mit Glide

Das Docking verschiedener Ligandenstrukturen in die vorbereiteten Kristallstrukturen des FimH wurde mit *Glide*^[89, 132-133] durchgeführt. Als erstes wurde dazu die Bindungsdomäne des FimH durch ein *RezeptorGrid* definiert. Mit Hilfe eines kristallisierten Liganden aus der Kristallstruktur wurde eine Box um die Bindungstasche definiert. Die Größe der Box wird nach der Größe der Ligandenstrukturen ausgewählt und aus den Informationen eine Zip-Datei erstellt. Mit der Anwendung *Glide LigandDocking* wurden dann das *RezeptorGrid* und die erstellten Konformationen der Liganden ausgewählt. Während des Dockings wird der Rezeptor starr gehalten, wohingegen der Ligand in seiner Konformation flexibel ist. Aus den Rechnungen werden *Docking-Scores* erhalten, die mit der Bindungsstärke der Liganden in der Bindungstasche des FimH korrelieren. Dabei bindet der Ligand umso stärker in die CRD, je niedriger sein *Docking-Score* ist. Der *Docking-Score* (=GlideScore) an sich ist eine einheitslose Größe, die sich aus den unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein ergibt. Die Berechnung erfolgt nach der untenstehenden Gleichung:

$$\text{GlideScore} = 0.065 \cdot \text{VdW} + 0.130 \cdot \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{Hbond} + \text{Metall} + \text{BuryP} + \text{RotB} + \text{Site} \quad (3)$$

Durch die Betrachtung der einzelnen Terme aus der verwendeten Gleichung lässt sich der Rechenvorgang nachvollziehen. Vor der Berechnung der ersten beiden Terme *VdW* und *Coul*, die für die Van-der-Waals-Energie bzw. die Coulomb-Energie zwischen Ligand und Protein stehen, wird der Protein-Ligand-Komplex unter Berücksichtigung von Wassermolekülen in der Bindungstasche zunächst optimiert. Durch die Faktoren 0.065 und 0.130 werden diese Werte an Referenzdaten angepasst.^[134] Der Term *Lipo* beschreibt die hydrophoben Wechselwirkungen; im Gegenzug dazu wird die Energie der Wasserstoffbrückenbindungen unter Berücksichtigung von Donoren und Akzeptoren durch den Term *Hbond* ausgedrückt. Der Term *Metall* ist für die Rechnungen in der vorliegenden Arbeit irrelevant, dient aber generell dazu, die Wechselwirkungen zwischen Metallkationen und negativ geladenen Akzeptoratomen zu erfassen. Durch den *BuryP*-Wert werden verborgene polare Gruppen berücksichtigt, der *RotB* Term beschreibt die fixierten, rotierbaren Bindungen und *Site* die polaren Wechselwirkungen in der Bindungstasche mit Ausnahme von Wasserstoffbrückenbindungen.

Kovalente Bindungsbildung und Durchführung der Diederwinkelscans

Für die Durchführung der Diederwinkelscans wurde zunächst die gedockte Beststruktur des DMAP-Intermediats (Kapitel 3.3.4) mit der jeweiligen Kristallstruktur in die *Maestro*^[23] *Workspace* geladen. Aus dieser Konformation heraus wurde zunächst der Teil des DMAP Liganden aus dem Intermediat gelöscht, so dass lediglich der Strukturteil des Azobenzols übrig blieb. Das Azobenzol wurde daraufhin manuell an ein Nukleophil des Proteins (Hydroxyl-Gruppe des TYR48, TYR137 oder THR51) gebunden. Die so erhaltene Struktur wurde anschließend mit *MacroModel*^[90] *Multiple Minimization* optimiert. Diese energieminierte Struktur wurde in 30°-Schritten parallel um jeweils zwei verschiedene Diederwinkel (Kapitel 3.3.4) rotiert und in jeder einzelnen Position energieminiert. Alle Scans wurden sowohl in der *trans*- als auch in der *cis*-Konfiguration des Azobenzols durchgeführt, wobei für die *cis*-Konfiguration die Winkel des Azobenzols in *MacroModel*^[90] wie folgt festgesetzt wurden:

Winkel	C-N-N	C-N-N-C	C-C-N-N
	121.9	6.5	53.3

Aus jeder Rechnung wurden insgesamt 170 Strukturen erhalten, von denen jeweils die potentielle Energie berechnet wurde. Die Strukturen mit den niedrigsten Energien geben die günstigsten Ausrichtungen des entsprechenden Azobenzolderivats wieder, sobald es an das Protein gebunden ist. Für eine genaue Betrachtung wurden alle Minima aus dem Scan um den Diederwinkel 1 gegen den Diederwinkel 2 aufgetragen und die günstigsten Strukturen graphisch dargestellt.

5.3.3 Molekulare Oberflächen

Zur Visualisierung der Proteinoberflächen wurden Connolly-Oberflächen^[22] verwendet. Ausgehend von einer Van-der-Waals-Oberfläche des Proteins, bei der jedes Atom einen kugelförmig dargestellten Van-der-Waals-Radius besitzt, wird diese Oberfläche zusätzlich mit einer Schicht an Solvensmolekülen (in diesem Fall Wasser) bedeckt (*solvent accessible surface*). Dazu wird die Van-der-Waals-Oberfläche mit einer Kugel mit definiertem Radius (meist 1.4 Å) abgetastet. Durch die Einfärbung dieser Oberfläche (nach Eigenschaften wie der

Lipophilie oder dem elektrostatischen Potential) können zusätzliche Information aus den erhaltenen Bildern gewonnen werden.

5.4 Biologische Methoden- und Versuchsbeschreibungen

Alle verwendeten Geräte und Gefäße wurden vor ihrer Benutzung autoklaviert. Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen wurde mit einem Jenway Spectrophotometer Model 7305 bestimmt. Zur Waschung der Mikrotiterplatten wurde ein Tecan Washer Hydroflex und zur Messung der Fluoreszenz ein Tecan infinite F200 Reader verwendet.

Verwendete Puffer

LB-Medium: Trypton (10.0 g), Natriumchlorid (10.0 g) und Hefeextrakt (5.00 g) wurden in 1 L bidest. Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und anschließend mit Antibiotikum (Ampicillin, 100 mg) und Chloramphenicol (50.0 mg) versetzt.

PBS-Puffer: Natriumchlorid (8.00 g), Kaliumchlorid (200 mg), Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (1.44 g) und Kaliumhydrogenphosphat (200 mg) wurden in 1 L bidest. Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 7.2 eingestellt.

PBST-Puffer: PBS-Puffer wurde mit 0.05 % Tween 20® versetzt.

Mannan-Lösung: 1.20 mg Mannan wurden in 1 mL Carbonatpuffer I (pH 9.2) gelöst.

Carbonat-Puffer I: Natriumcarbonat (1.59 g) und Natriumhydrogencarbonat (2.52 g) wurden in 1L bidest. Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 9.2 eingestellt.

Carbonat-Puffer II: Natriumcarbonat (1.59 g) und Natriumhydrogencarbonat (2.52 g) wurden in 1L bidest. Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 7.8 eingestellt.

HEPES-Puffer: Es wurde eine 10 mM Lösung HEPES in bidest. Wasser angesetzt und auf einen pH-Wert von 8 eingestellt.

Bakterienstamm

Für den Inhibitionsassay wurde der Bakterienstamm pPKL1162 aus der Arbeitsgruppe von P. KLEMM verwendet, welcher aus dem Stamm SAR18 hervorgeht. Dabei wurde der *E. coli*-Stamm CSH26 (Genotyp: ara, $\Delta(lac-pro)$, thi) in der Arbeitsgruppe von A. REISER mit dem

Vektor pGFPmut3.1 transformiert. In dem neuen Stamm SAR18 (Genotyp: CSH26 attB::bla-P_{A1/04/03}-gfpmut3*-T₀) wurde das Plasmid pPKL174 kloniert. Dieses Plasmid enthält fim-kodierte Gene. Die so geschaffenen Bakterien pPKL1162 besitzen nur Typ-1-Fimbrien und können grün fluoreszieren.

Kultivieren und Ernten der Bakterien

Der Bakterienstamm pPKL1162 wurde in ein Reagenzglas in 5 mL LB^{Amp+CAM}-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 4 °C und 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und der Rückstand in 2 mL PBS-Puffer resuspendiert. Nach 15 min erneut zentrifugieren bei 4 °C und 4000 rpm wurde der Überstand abdekantiert. Es wurde ein weiteres Mal resuspendiert und zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit PBS-Puffer verdünnt, so dass sich eine Konzentration von $3 \cdot 10^8$ Bakterien/mL einstellte. Die Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte (OD = 0.4) bestimmt.

Inhibitionsassay

Für den Inhibitionsassay wurden schwarze 96-well-Mikrotiterplatten der Firma Thermo Fisher verwendet, welche im ersten Schritt mit Mannan beschichtet wurden. Dazu wurden 100 µL/well in die Platten pipettiert und über Nacht bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit 150 µL/well PBST-Puffer gewaschen und mit BSA blockiert, indem 120 µL/well BSA-Lösung auf die Platten pipettiert und die Platten für 2 h bei 37 °C und 100 rpm inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Platten zweimal mit 150 µL/well PBST-Puffer und einmal mit 150 µL/well PBS-Puffer gewaschen. In die Spalten 2-12 jeder Platte wurden 50 µL/well PBS-Puffer vorgelegt. In die Spalten 1-2 wurden je 50 µL/well Inhibitor-Lösung zugegeben. Ausgehend von der zweiten Spalte wurde eine serielle Verdünnungsreihe durchgeführt. Schließlich wurden 50 µL/well Bakteriensuspension (2 mg/mL) zugegeben und die Platten für 1 h bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten zweimal mit 150 µL/well PBS-Puffer gewaschen. Für die Messung wurden erneut 100 µL/well PBS-Puffer zupipettiert. Die Fluoreszenz wurde anschließend im Fluoreszenz-Reader ausgelesen (Extinktionswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 535 nm).

Anhand der sigmoidalen Kurve kann die Inhibitorkonzentration, bei der 50 % der Bakterien-Adhäsion inhibiert wurde (IC_{50}), ermittelt werden. Relative inhibitorische Potenzen (RIP) in Relation zum Standardinhibitor MeMan wurden mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$RIP = \frac{IC_{50}(\text{MeMan})}{IC_{50}(\text{getesteter Inhibitor})} \quad (4)$$

Funktionalisierung von Polystyrolplatten

Von einer 50 mM Lösung 4-Aminophenol in Carbonatpuffer I wurden je 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ auf eine NHS-funktionalisierte Polystyrolplatte pipettiert und über Nacht bei Raumtemp. im Inkubator geschüttelt. Die Platte wurde anschließend dreimal mit 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBST-Puffer gewaschen. Für die Blockierung der Platte wurden 120 $\mu\text{L}/\text{well}$ einer 10 mM Lösung von Ethanolamin in Carbonatpuffer I pipettiert und 2 h bei Raumtemp. und 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurde zweimal mit 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBST- und einmal mit 150 μL PBS-Puffer gewaschen.

FimH truncate:

Alle Markierungsreaktionen mit dem Lektin FimH wurden mit dem modifizierten FimH *truncate* (FimH_{tr}, Arbeitsgruppe S. D. KNIGHT, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Molecular Biology, Uppsala) durchgeführt, welches im Gegensatz zu dem ursprünglichen FimH eine am C-Terminus um 119 Aminosäuren gekürzte Sequenz hat und zusätzlich mit zwei Glycin-Resten und einem 6-His-Tag versehen wurde, welches die Aufreinigung und Isolierung des Proteins vereinfacht. Für das FimH_{tr} ergibt sich somit die folgende Aminosäuresequenz:

```
FACKTANGT  AIPIGGGSAN  VYVNLAPVVN  VGQNLVVDLS  TQIFCHNDYP
ETITDYVTLQ  RGSAYGGVLS  NFSGTVKYSG  SSYPFPTTSE  TPRVVYNSRT
DKPWPVALYL  TPVSSAGGVA  IKAGSLIAVL  ILRQTNNYNS  DDFQFVWNIY
ANNDVVVPT  GGHHHHHHH
```

Verwendete Standardpeptide:

Für Markierungsversuche wurden verschiedene Standardpeptide aus der Arbeitsgruppe von A. THOLEY (Kiel) verwendet, welche aus den folgenden Aminosäuresequenzen bestehen:

M2: ILMEHIHKL

M3: YLLPAIVHI

M6: ETIPLTAEKL

M7: EIAMATVTALR

M8: ETIGEILKK

T3: EGHIARNCRA

S17: RPQYAEASWNAR

Glu1-Fib B: EGVNDNEEGFFSAR

Bestrahlungsversuche mit den Standardpeptiden **M2**, **M3**, **M7**, **M8**, **T3** und **S17**

Versuche im Verhältnis Peptid/Diazirin, 1:1

500 pmol Peptid, gelöst in 5 μ L bidest. Wasser (18 M Ω) inkl. 5 % Acetonitril, wurde zusammen mit 500 pmol Diazirinligand **4** in 12.9 μ L Methanol für 10 min bei 37 °C im Inkubator geschüttelt und anschließend 10 min mit einer Mitteldruck-Quecksilberdampflampe unter Eiskühlung bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde der Reaktionslösung 50 μ L bidest. Wasser zugefügt. Für die Untersuchung per MALDI-MS wurden 2 μ L (~50 pmol Peptid) der Reaktionslösung in 20 μ L 0.1 % Trifluoressigsäure gelöst, über ein C18 μ ZipTip entsalzt und direkt auf eine MALDI-Platte mit 5 mg/mL HCCA-Matrix in 70 % Acetonitril in 0.1 % TFA-Lösung in bidest. Wasser (18 M Ω) eluiert.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Ligand über die μ ZipTip-Entsalzung aus der Lösung entfernt wurde, wurden zusätzlich je 1 μ L (~7 pmol) über das dried droplet-Verfahren auf die MALDI-Platte aufgetragen.

Für die FT-MS/MS-Versuche wurden die Proben am ESI LTQ Orbitrap Velos im offline Modus vermessen und die ETD-Fragmentierungsmethode verwendet.

Versuch im Verhältnis Peptid/Diazirin 10:1

250 μL einer 2mM Lösung von **S17** in bidest. Wasser (18 M Ω) und 250 μL einer 200 μM Lösung von Diazirin **4** in Methanol wurden zusammen 10 min bei 37 °C im Inkubator geschüttelt und anschließend unter Eiskühlung 10 min mit einer Mitteldruck-Quecksilberdampfampe bestrahlt. 100 pmol (bezogen auf das Peptid) wurden wie in den vorherigen Versuchen mit μZipTip entsalzt bzw. im dried droplet-Verfahren auf eine MALDI-Platte aufgetragen und massenspektrometrisch analysiert.

Bestrahlungsversuche mit FimH_{tr}

3.36 nmol FimH_{tr} wurde in PBS-Puffer mit pH 7.8 gelöst. Der Ligand **4** wurde in Acetonitril bzw. DMSO gelöst. Der Ligand wurde zu dem Protein in 70-fachen Überschuss gegeben. Dabei bestand das Endvolumen von 11 μL aus 20 % Acetonitril bzw. 10 % DMSO. Ligand und Protein wurden 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 min mit einer Mitteldruck-Quecksilberdampfampe unter Eiskühlung bestrahlt. Die Proben wurden anschließend massenspektrometrisch untersucht. Für alle Lösungsmittelansätze konnte eine positive Insertionsreaktion in geringer Ausbeute detektiert werden

Durchführung der Markierungsversuche auf funktionalisierten Polystyrolplatten

Die Markierungsversuche auf der Oberfläche wurden mit funktionalisierten Polystyrolplatten (siehe oben) durchgeführt. Für die Reaktion wurden 100 $\mu\text{L/well}$ des DMAP-Liganden **51** (10 mM in HEPES-Puffer) und 100 $\mu\text{L/well}$ des Thioesters **76** (10 μL in HEPES-Puffer inkl. 20 % DMSO) auf die Platte pipettiert und über Nacht bei 37 °C im Inkubator bei 100 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Platten mit je 150 $\mu\text{L/well}$ dreimal mit PBST, zweimal mit DMSO, dreimal mit PBST, einmal mit DMSO, dreimal mit PBST und schließlich noch einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden 100 $\mu\text{L/well}$ der Bakterienlösung in PBS pipettiert und 1 h bei 37 °C und 100 rpm im Inkubator geschüttelt. Daraufhin wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen und die *wells* mit 100 $\mu\text{L/well}$ PBS wieder aufgefüllt. Die gebundenen GFP-markierten Bakterien wurden mittels Fluoreszenz-Readout ausgelesen. Zusätzlich zu der Reaktion wurden Kontrollreihen durchgeführt, in die einmal nur Puffer, einmal nur der DMAP-Ligand und in eine andere Reihe nur der Thioester pipettiert wurde. Die Ergebnisse jeder Versuchsreihe wurden aus fünf *wells* bestimmt.

Durchführung der Markierungsversuche der Peptide **M3**, **M6**, **Glu1-Fib B**:

Zu einer Lösung eines Peptids (10 nmol) in 5 μ L bidest. Wasser inkl. 5 % Acetonitril wurde 6.75 μ L HEPES-Puffer sowie 17.5 μ L DMAP-Ligand **51** (21.7 μ g, 50 nmol) in HEPES-Puffer und 6.75 μ L Thioester **52** (16.6 μ g, 50 nmol) in DMSO gegeben.

Alle Komponenten wurden in einem 100 μ L Eppendorf Cup zusammengegeben und im Inkubator bei 37 °C und 100 rpm über Nacht geschüttelt. Die Mischung wurde mit einem ZipTip-C18 Protokoll gereinigt und anschließend im MALDI-MS mit HCCA als Matrix sowie im ESI-Orbitrap-Massenspektrometer untersucht.

Durchführung der Markierungsversuche des FimH_{tr} nach der DMAP-Ligationsmethode

Für jede Reaktion wurde ein Volumen von 40 μ L gewählt. Als Lösungsmittel wurde HEPES-Puffer mit wechselnden Anteilen an Acetonitril bzw. DMSO gewählt. Für jeden Ansatz wurden 840 pmol FimH in HEPES-Puffer mit 4.2 nmol DMAP-Ligand **51** ebenfalls in Puffer gelöst für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 4.2 nmol des jeweiligen Thioesters, gelöst in Acetonitril oder DMSO hinzugegeben und die Lösung vorsichtig mit der Pipette vermischt. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 11 h bei 25 °C im Inkubator geschüttelt. Danach wurden die Ansätze bis zur massenspektrometrischen Untersuchung eingefroren.

Durchführung der enzymatischen Hydrolyse von FimH_{tr}

Für die enzymatische Hydrolyse mit Pepsin wurden 2 μ g der Probe i. Vak. zentrifugiert und der erhaltene Feststoff erneut in 20 μ L 0.02 M Salzsäurelösung gelöst. Zur Reduktion der Disulfidbindungen des FimH_{tr} wurde TCEP zugegeben (2 μ L einer 200 mM Stammlösung) und für 30 min bei 56 °C inkubiert. Die Probe wurde auf Raumtemp. abgekühlt und mit 50 ng Pepsin (1:40 Enzym/Protein-Verhältnis) versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf 500 fmol/ μ L mit 0.1 % Trifluoressigsäure mit 3 % Acetonitrilanteil verdünnt. Von dieser Lösung wurde 1 μ L per Nano-UHPLC-MS analysiert.

Durchführung der LC-MS Messungen

Nano-UHPLC-Massenspektroskopie wurde an einem UltiMate 3000RSL Nano/Cap System (Thermo Scientific) online gekoppelt an ein Orbitrap QExactive (Thermo Scientific) durchgeführt. Die Proben wurden 4 min mit einer Flussrate von 30 μ L/min mit 3 % Acetonitril

und 0.1 % Trifluoressigsäure entsalzen (Acclaim PepMap 100 C-18, 300 μm , I.D. x 5 mm, 5 μm , 100 \AA). Für die analytische Trennung wurde eine Acclaim PepMap100 C-18-Säule (75 μm I.D. x 500 mm, 2 μm , 100 \AA) mit einer Flussrate von 300 nL/min mit einer Puffermischung als Eluent verwendet (Puffer A: 0.05 % Ameisensäure, Puffer B: 80 % Acetonitril und 0.04 % Ameisensäure). Die Probe wurde mit einem Gradienten von 5-50 % B (4-30 min) und 50-90 % B (30-35 min) eluiert, gefolgt von einem isokratischen Waschschrift von 90 % B (35-45 min) und einem Äquilibrationsschritt der Säule mit 5 % B (45-60 min). MS-Messungen wurden in einem Massenbereich von 300-2000 m/z bei einer Auflösung von 70000 durchgeführt. Die zehn intensivsten Signale wurden mittels HCD-Fragmentierung (engl.: *Higher-energy collisional dissociation*) untersucht. (MS-Parameter: Minimumsignalintensität: 1000, Isolationsbreite: 3.0 Da, Ladungsstatus: ≥ 2 , HCD-Auflösung: 15000, normalisierte Kollisionsenergie von 25, *Lock mass*: 445.120025).

Datenbank Suche der Peptidfragmente

HCD-Spektren wurden mit Hilfe des Programms Proteome Discoverer 1.4 (1.4.0.288) mit einem Mascot Suchalgorithmus (in Kombination mit Daten aus der anerkannten *mouse Datenbank*) untersucht. Einstellungen für die Datenbank-Suche: MS-Toleranz; ± 5 ppm, MS2-Toleranz; 0.02 Da, Enzymspezifität; kein Enzym; potentielle Modifikationen des Proteins am *N*-Terminus, Lysin, Serin, Tyrosin, und Threonin. Nur Peptide mit einem FDR-Wert < 5 % wurden berücksichtigt.

6 Anhang

6.1 MS-Versuche

6.1.1 Spektren Photomarkierung (Kapitel 3.1)

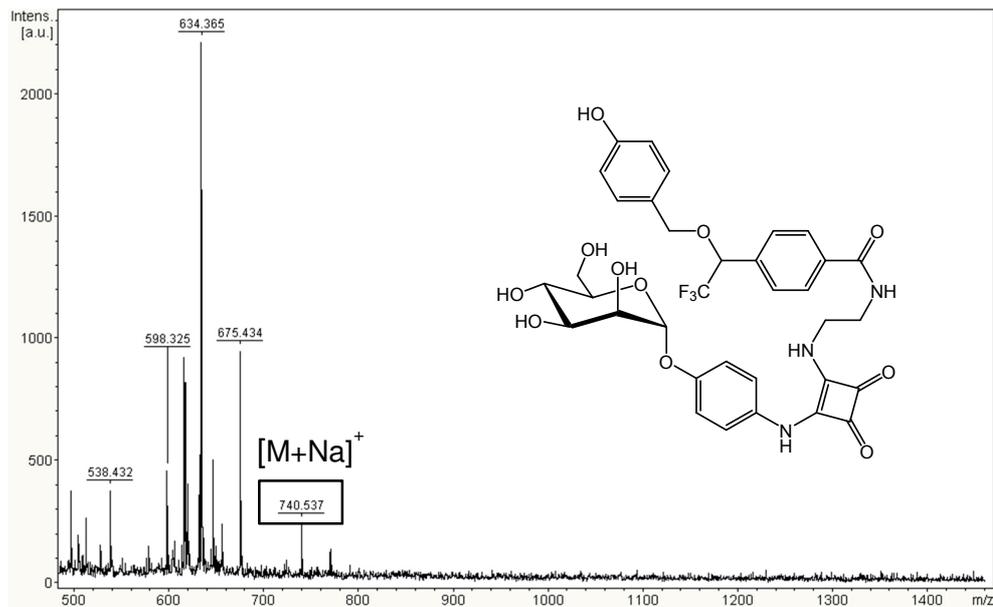
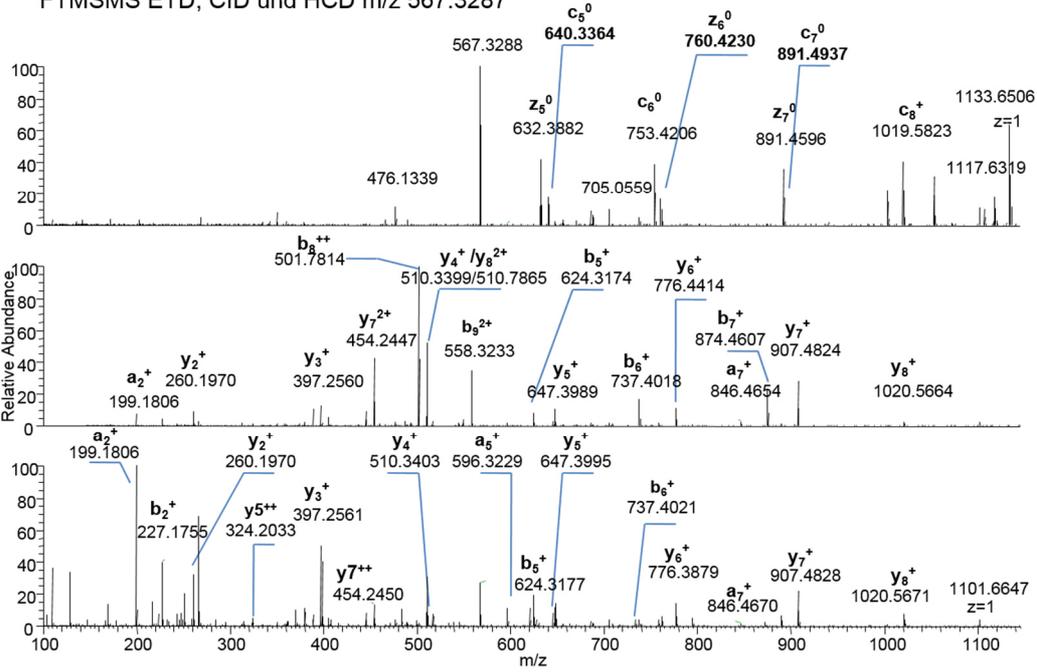


Abb. 96: MALDI-MS-Spektrum nach der Bestrahlung von Ligand **5** mit 4-Hydroxybenzylalkohol mit Strukturvorschlag des Produktes.

Peptid **M2** ILMEHIHKL
FTMSMS ETD; CID und HCD m/z 567.3287



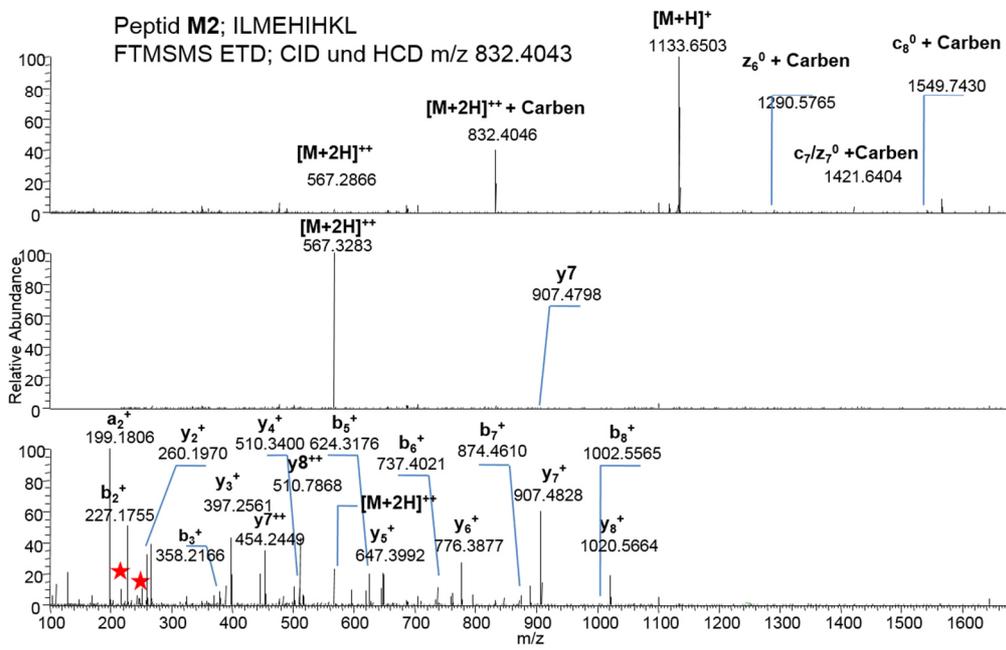
M2-ohne
Ligand
ETD - MSMS

M2-ohne
Ligand
CID - MSMS

M2-ohne
Ligand
HCD - MSMS



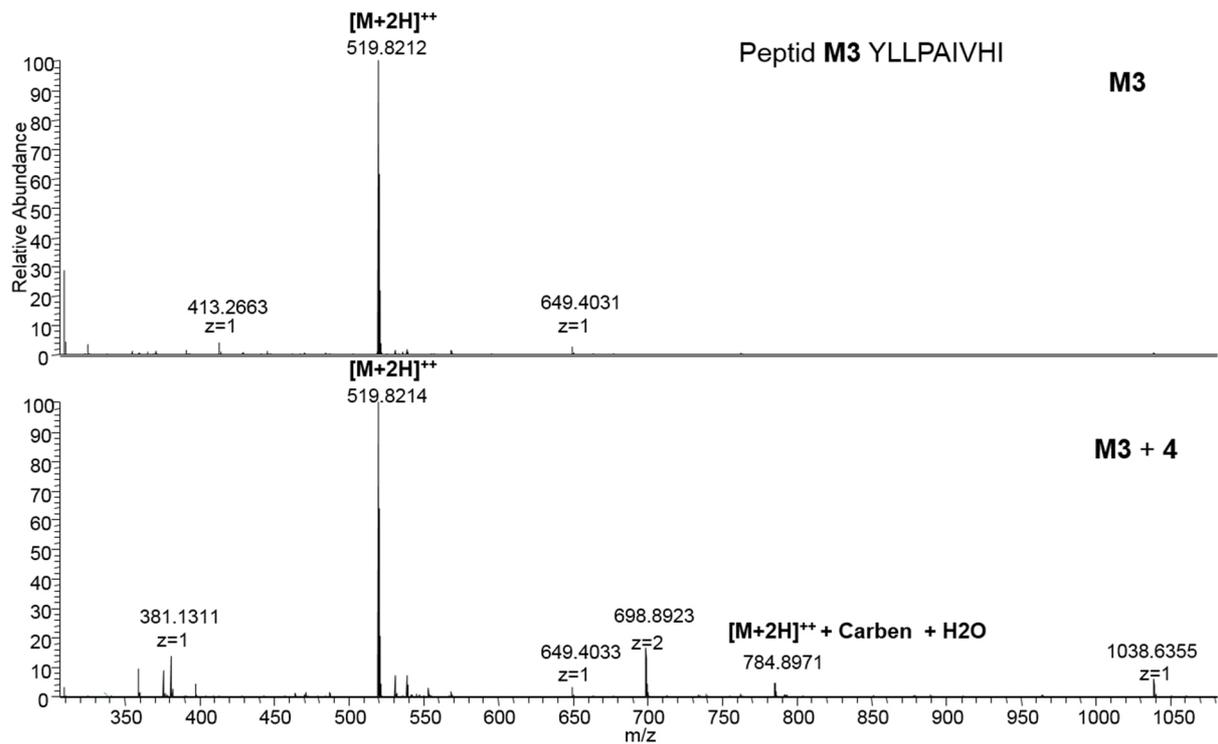
Peptid **M2**; ILMEHIHKL
FTMSMS ETD; CID und HCD m/z 832.4043



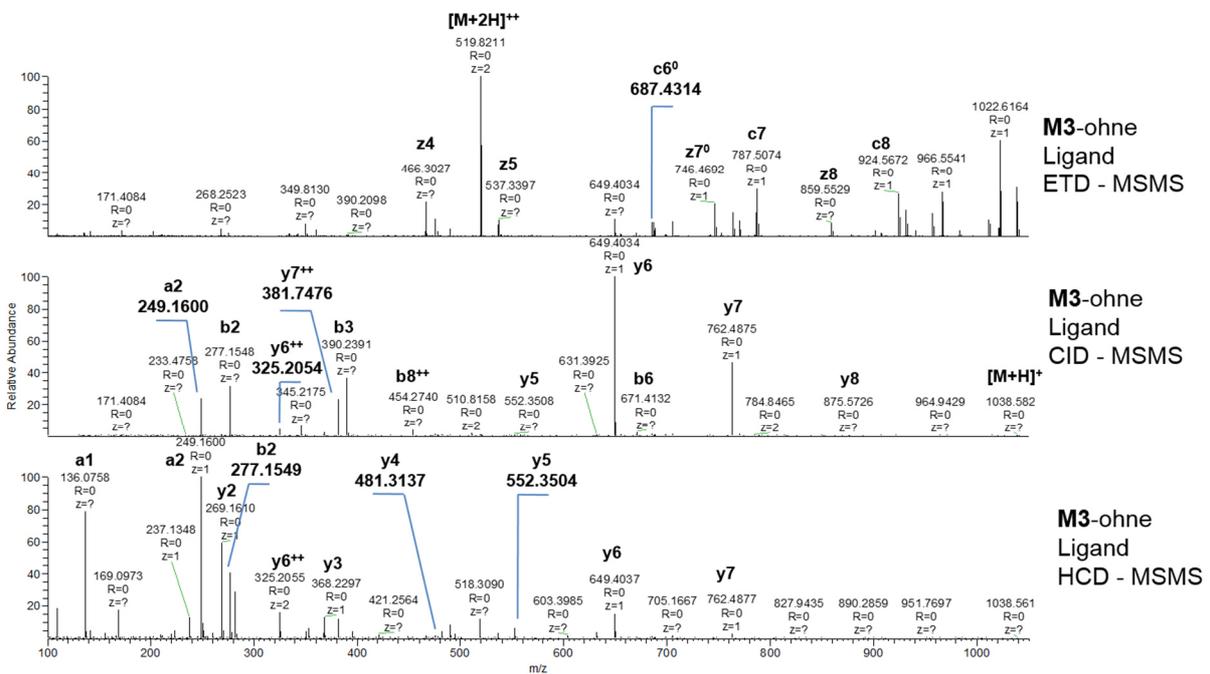
M2-mit
Ligand
ETD - MSMS

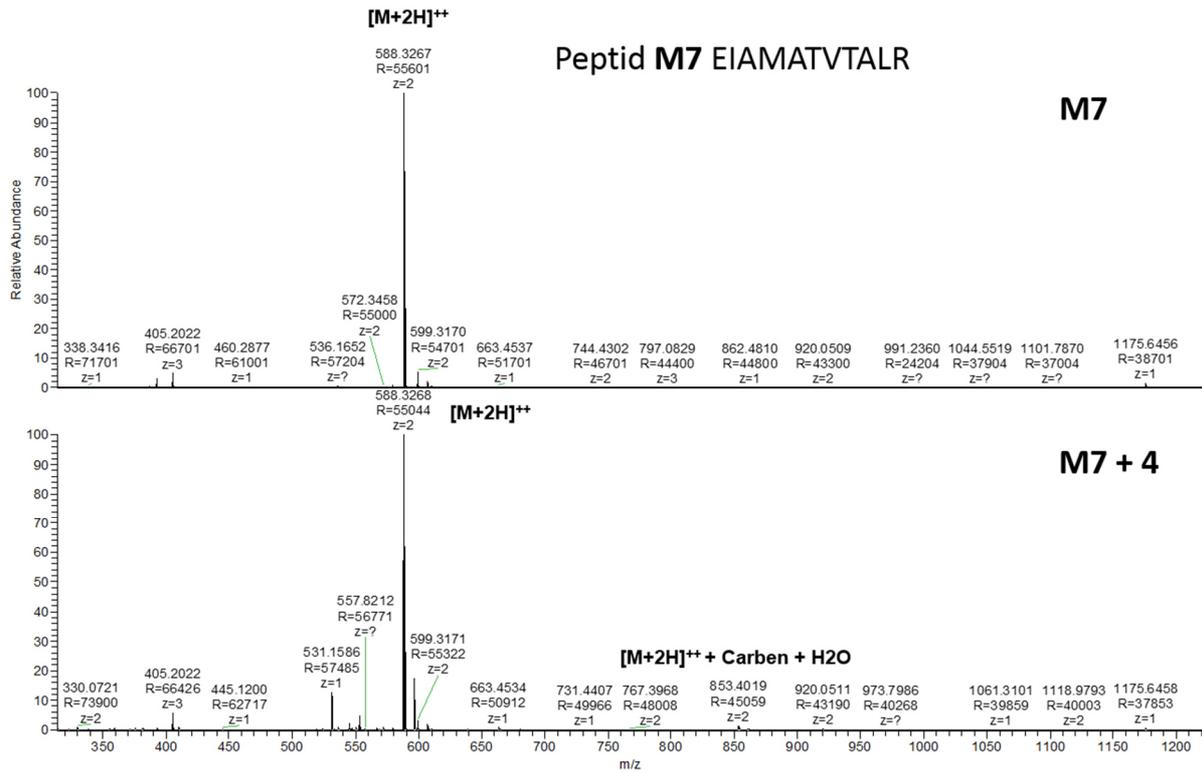
M2-mit
Ligand
CID - MSMS

M2-mit
Ligand
HCD - MSMS

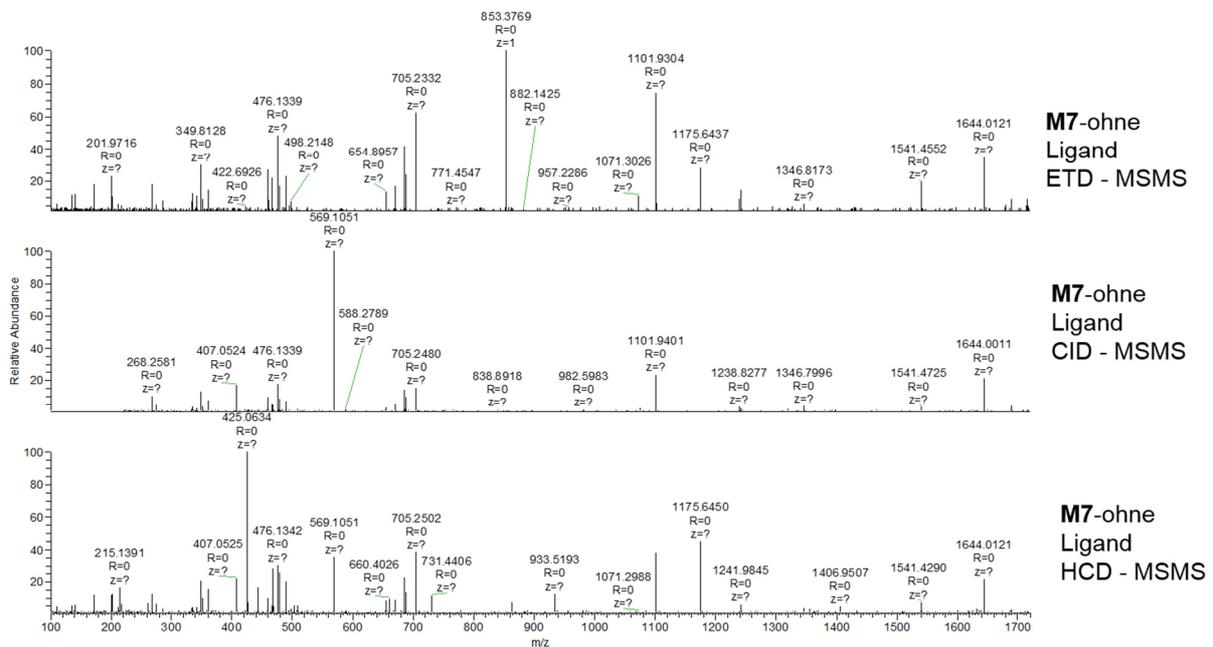


Peptid **M3** YLLPAIVHI
FTMSMS ETD; CID und HCD m/z 519.8212

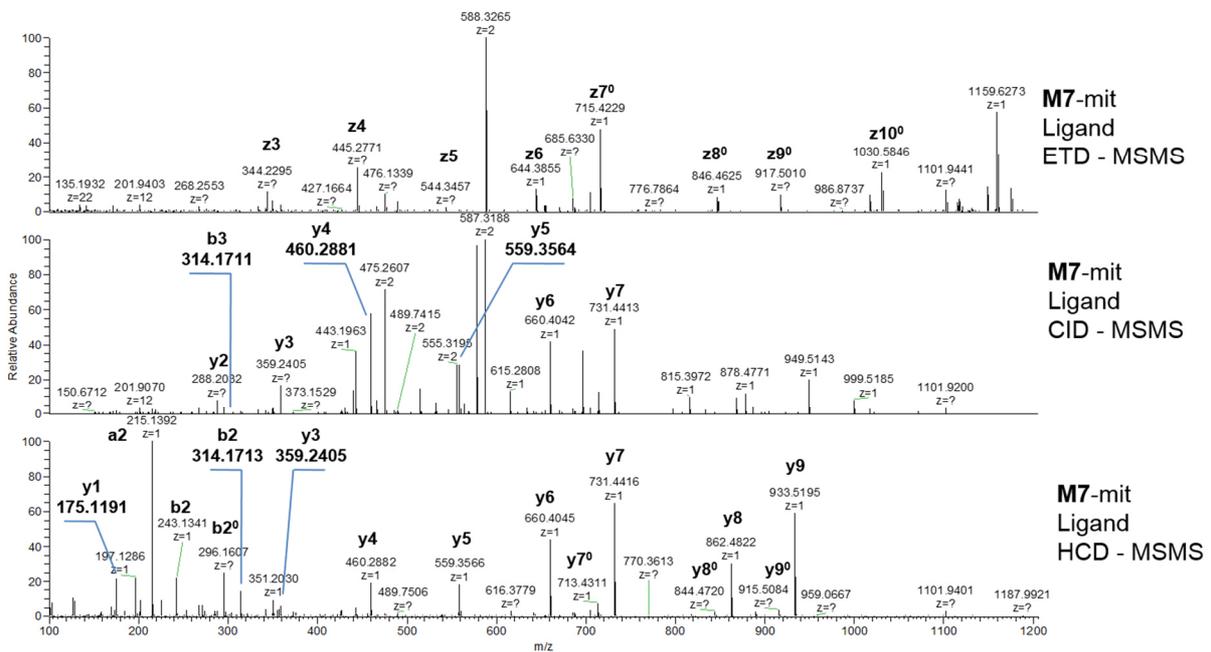




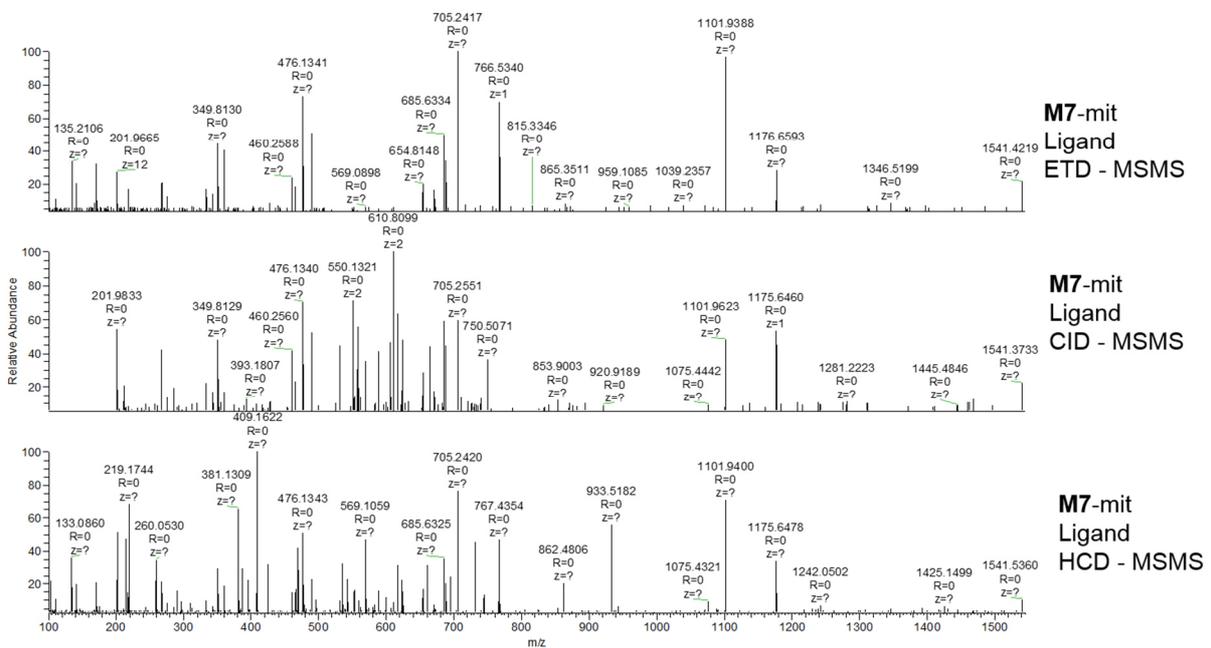
Peptid M7 EIAMATVTALR
FTMSMS ETD; CID und HCD m/z 853.4019

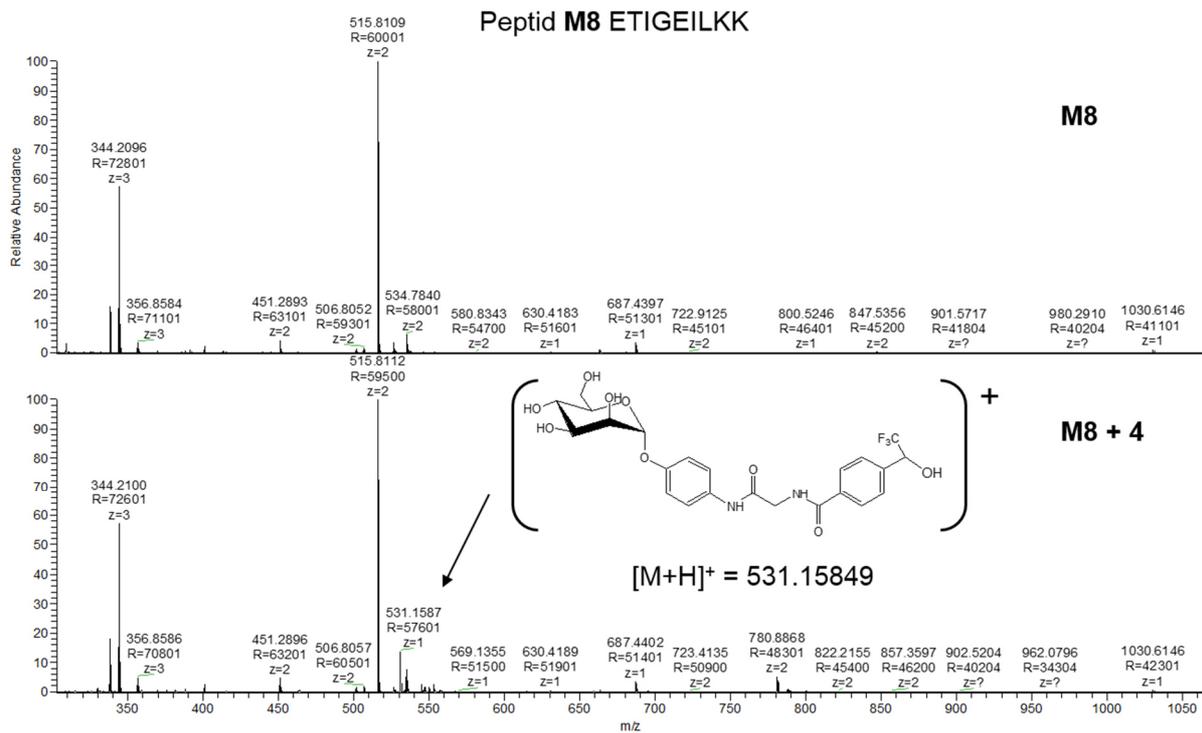


Peptid **M7** EIAMATVTALR
FTMSMS ETD; CID und HCD m/z 588.3267

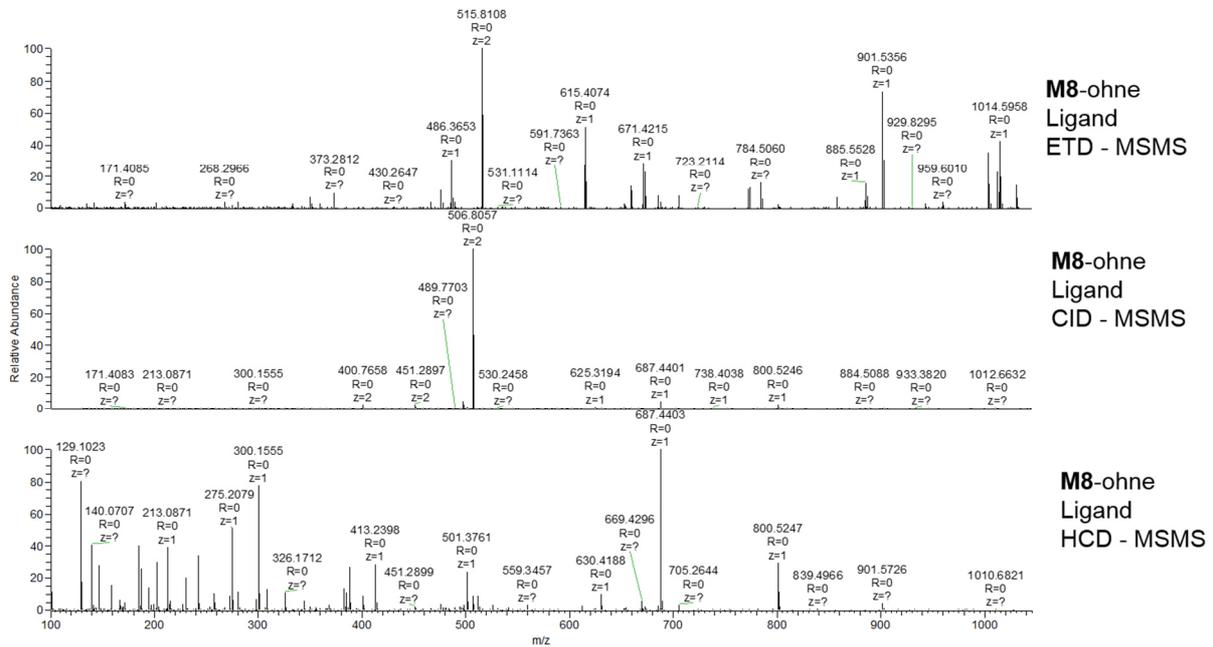


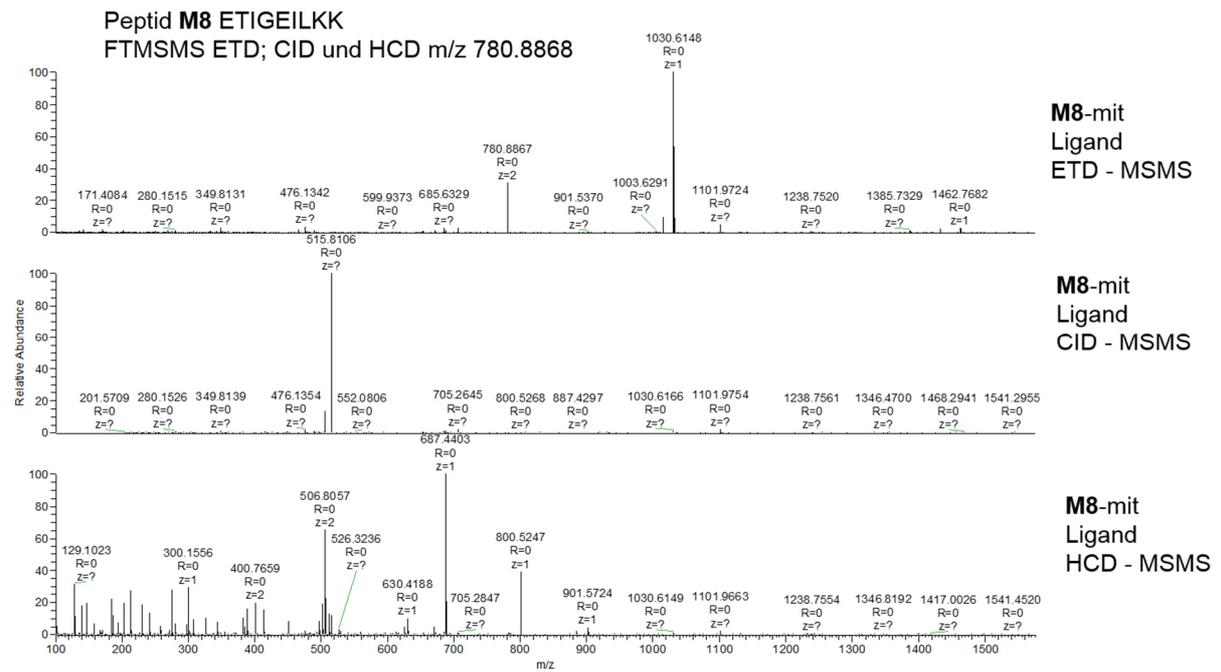
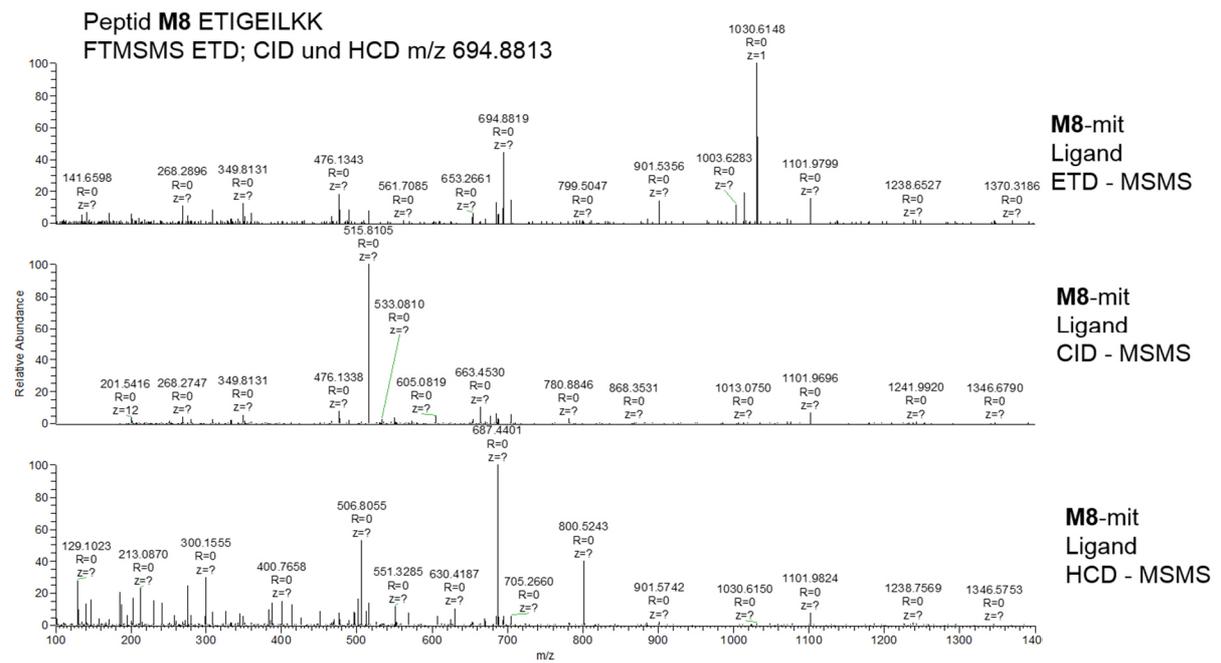
Peptid **M7** EIAMATVTALR
FTMSMS ETD; CID und HCD m/z 767.3968

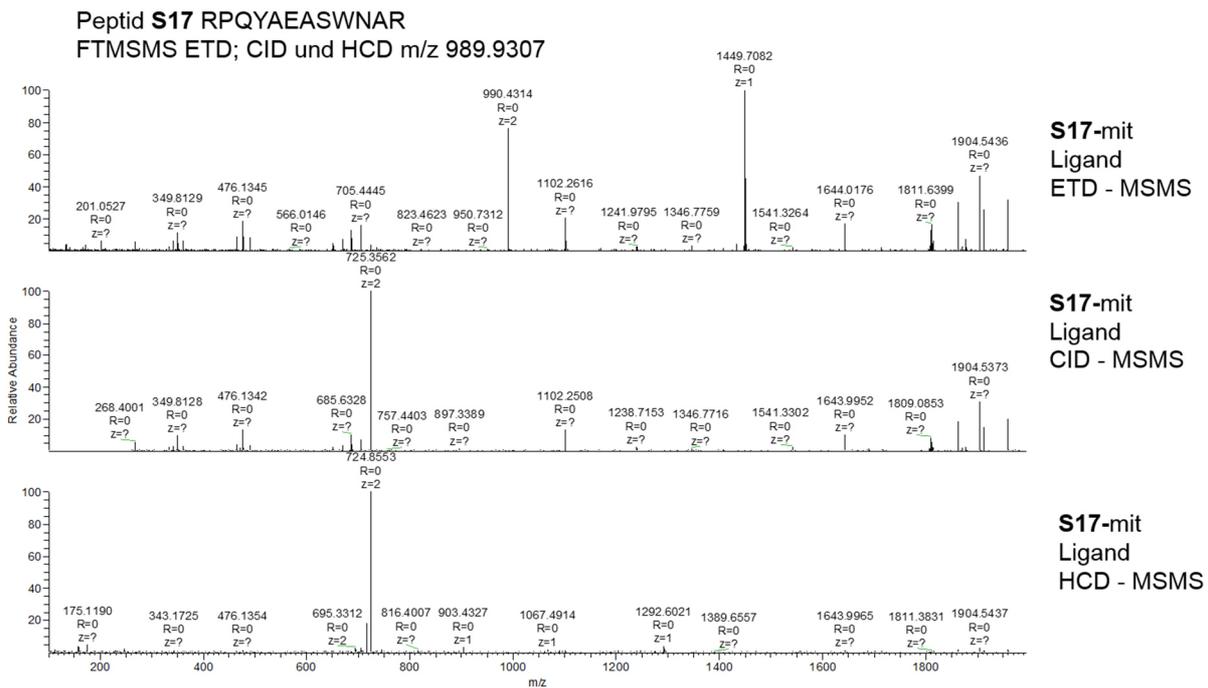
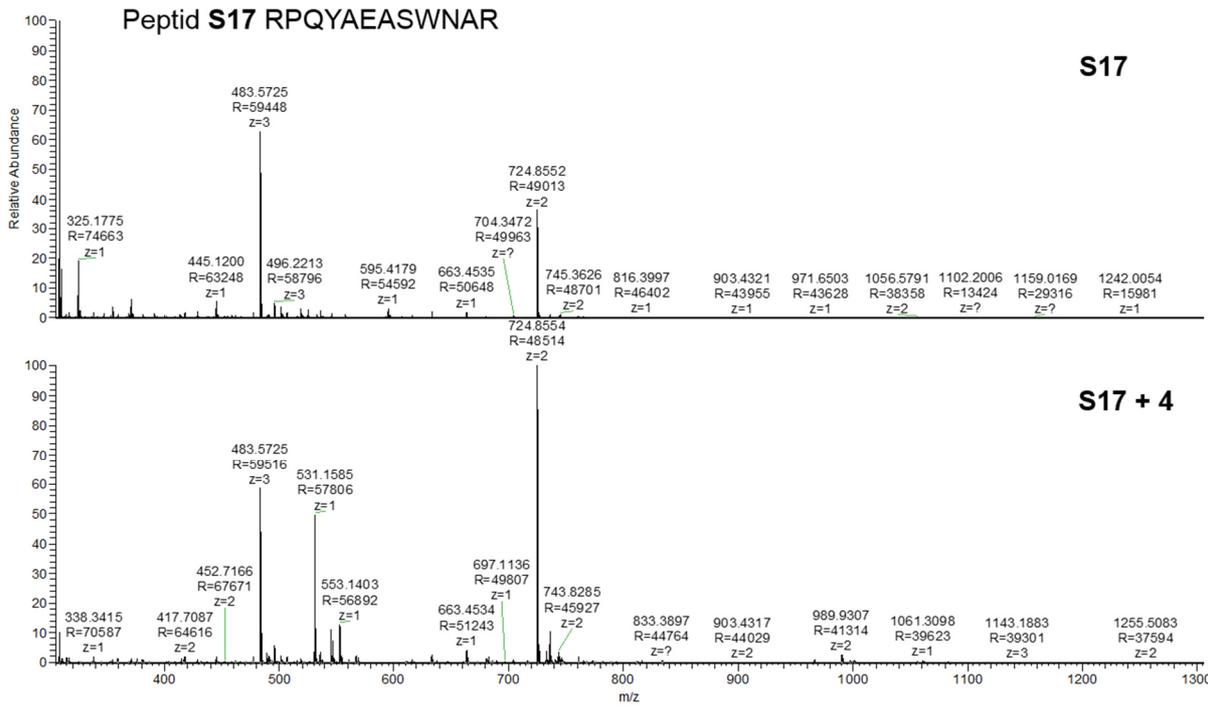




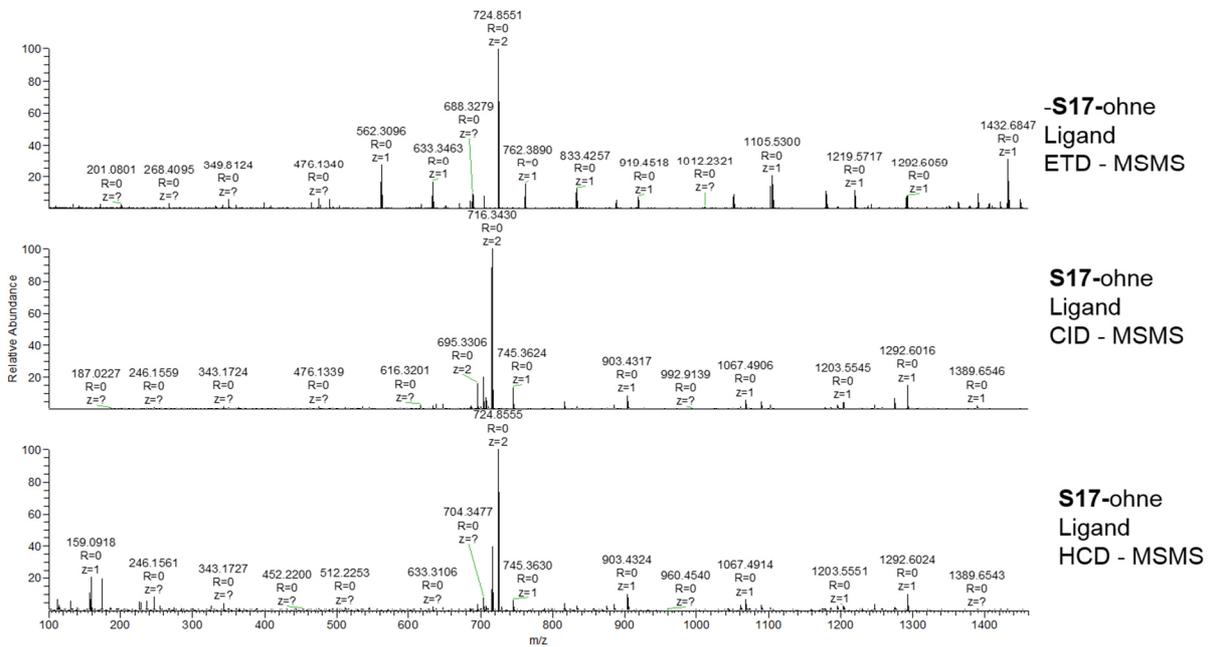
Peptid M8 ETIGEILKK
FTMSMS ETD; CID und HCD m/z 515.8109



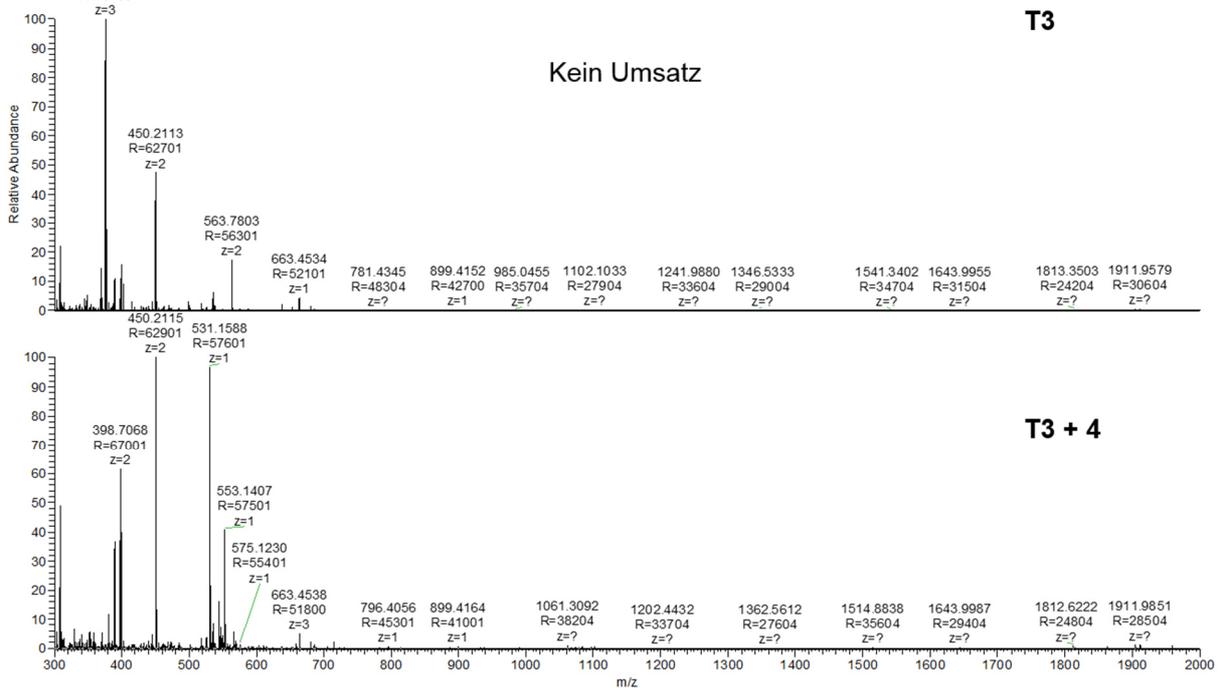




Peptid **S17** RPQYAEASWNAR
FTMSMS ETD; CID und HCD m/z 724.8552



Peptid **T3** EGHARN CRA



6.1.2 Spektren DMAP-Ligationschemie (Kapitel 3.3)

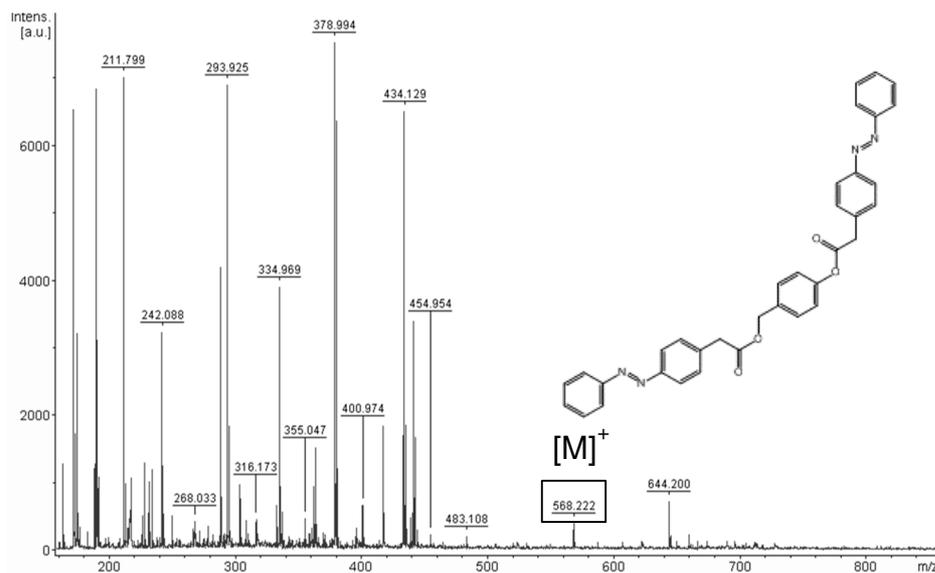


Abb. 97: MALDI-MS-Spektrum des DMAP-Ligationsversuchs von **51** und **52** mit 4-Hydroxybenzylalkohol in Wasser (pH-Wert = 8) mit 50 % Acetonitril. In dem gezeigten Spektrum wurde der Massenpeak des zweifach modifizierten Benzylalkohols detektiert (siehe Strukturvorschlag).

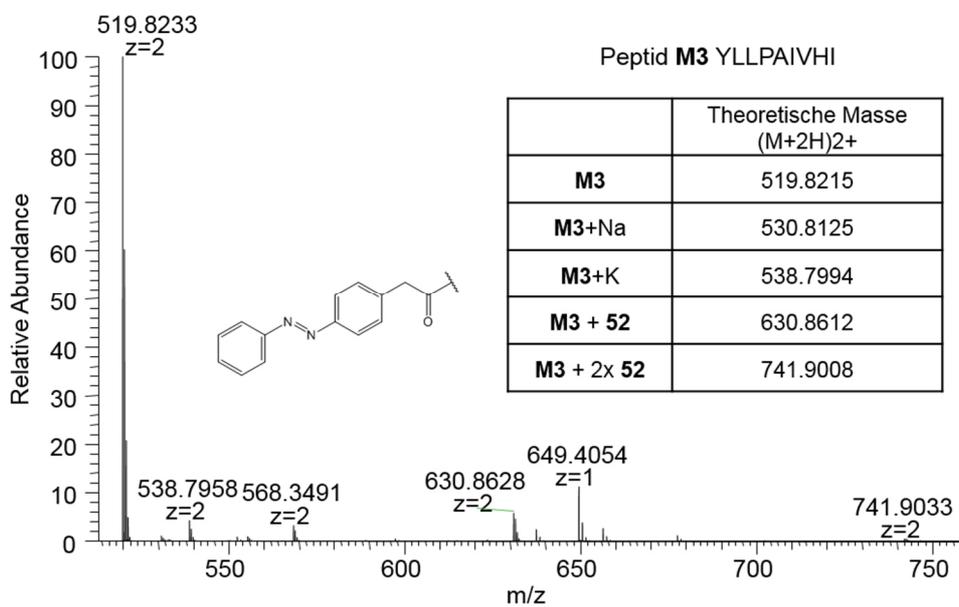


Abb. 98: ESI-MS-Spektrum von **M3** in HEPES-Puffer (pH-Wert = 8) und 50 % Acetonitril nach Reaktion von **51** und **52** zeigt Massenpeaks des einfach und zweifach modifizierten Peptids.

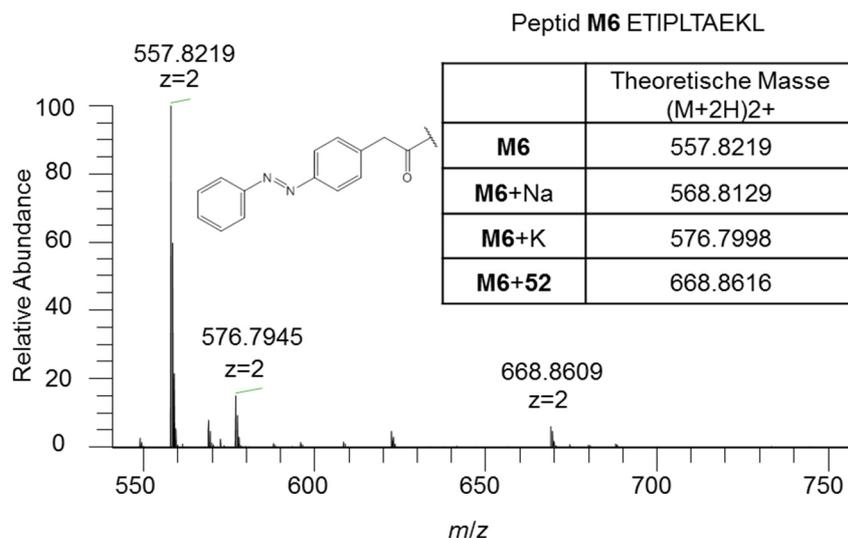


Abb. 99: ESI-MS-Spektrum nach der Reaktion von Ligand **51** und Thioester **52** mit dem Peptid **M6** in HEPES-Puffer (pH-Wert = 8) mit 50 % Acetonitril.

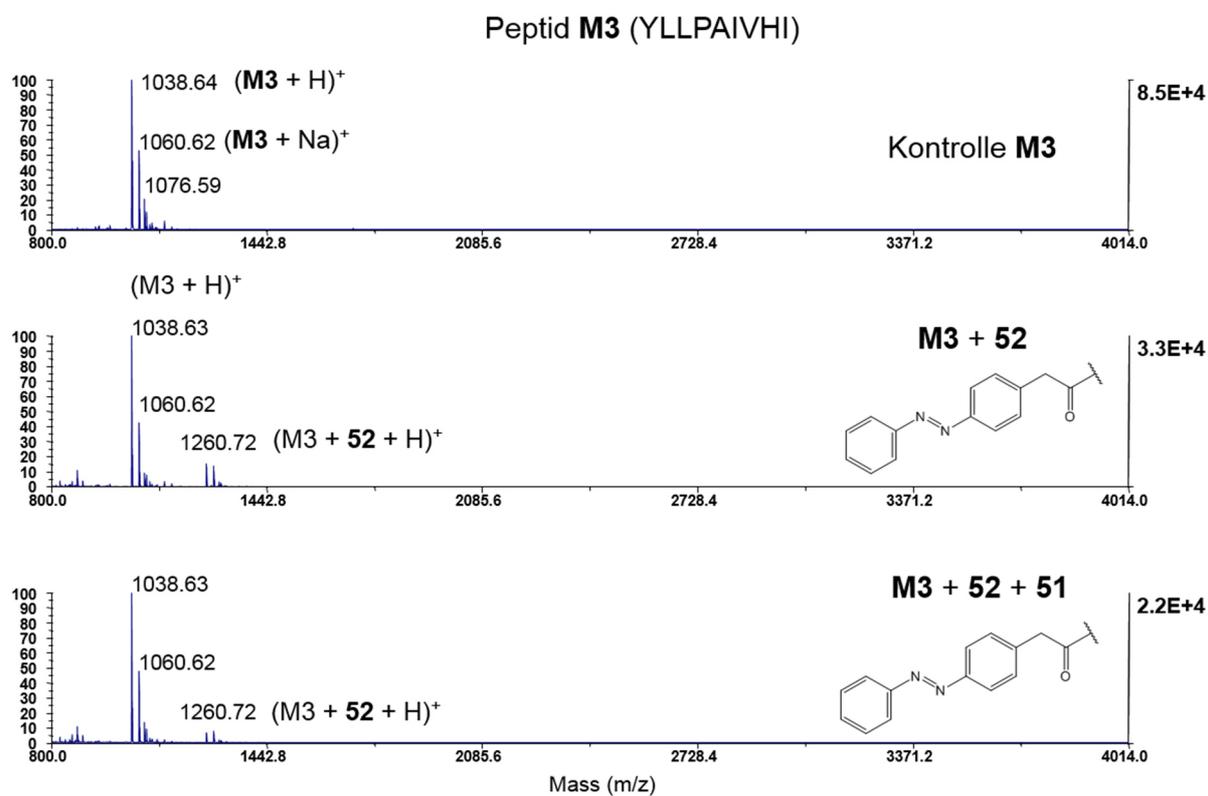


Abb. 100: MALDI-MS-Spektren der Peptide **M3** und **M6** in HEPES-Puffer und 50 % DMSO. (Oben: Vor der Reaktion; Mitte: nach Reaktion mit Azobenzolthioester **52**; unten: nach Reaktion mit Azobenzolthioester **52** und DMAP-Katalysator **51**.)

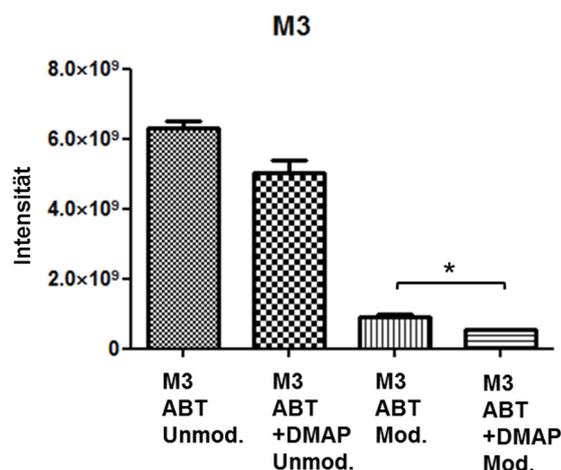


Abb. 101: Im ESI-MS wurde die Modifikationsrate von **M3** bei der katalysierten Reaktion mit **51** und **52** im Vergleich zur nicht katalysierten Reaktion mit **52** untersucht. In dem Versuch war die Modifikationsrate für die nicht katalysierte Reaktion höher. Da allerdings die Ausgangskonzentration an nicht modifiziertem Peptid unterschiedlich zu sein scheint, kann aus diesem Versuch keine genaue Aussage über die Modifikationsrate im Vergleich getroffen werden. Trotzdem wird hieraus ersichtlich, dass der Thioester auch ohne die Katalyse in nicht geringem Anteil an das Peptid reagieren kann.

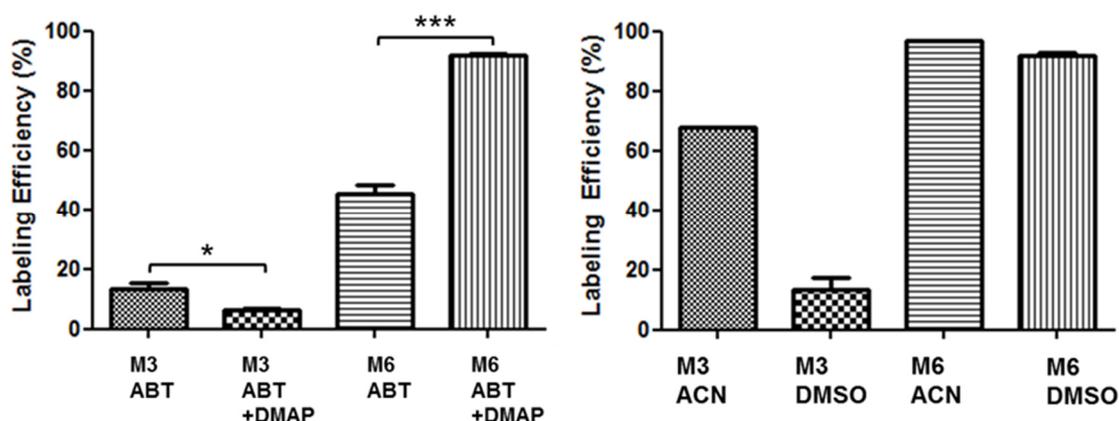


Abb. 102: Links: Die Effizienz der Markierungsreaktion mit und ohne Katalysator wurde im MALDI-MS für die Peptide **M3** und **M6** untersucht. In einer automatisierten Sequenz wurden je 2000 Schuss verteilt auf vier Spots gemessen und die Werte durch folgende Formel bestimmt $[\frac{x}{x+y}] \cdot 100$, wobei x die Intensität des modifizierten und y die Intensität des unmodifizierten Peptids repräsentiert. Für die ermittelten Werte ergeben sich p -Werte von $p^* < 0.05$, $p^{***} < 0.001$. Rechts: Die Effizienz der Reaktion in 50 % DMSO wurde mit der Reaktion in 50 % Acetonitril verglichen. Die Daten der ACN Versuche stammen dabei aus einer einzelnen Messung.

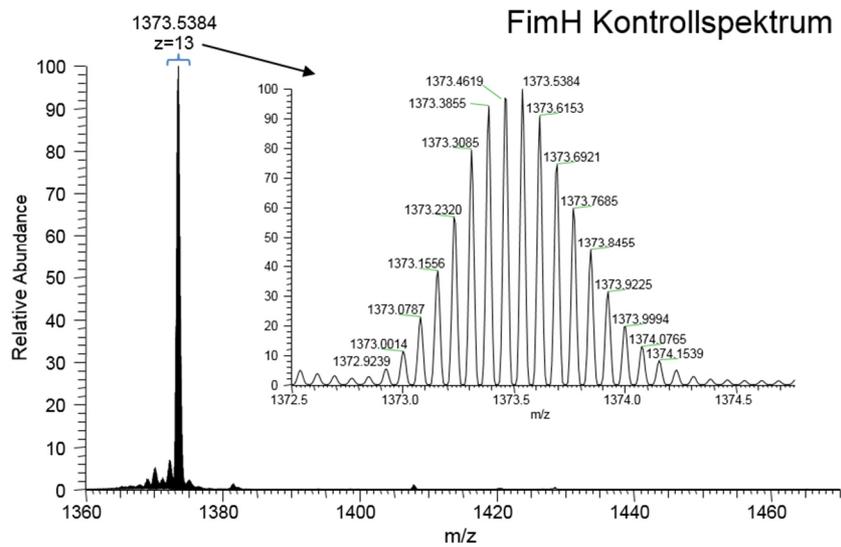


Abb. 103: ESI-MS-Spektrum des verwendeten FimH_{tr} ($m/z = 1375.5$).

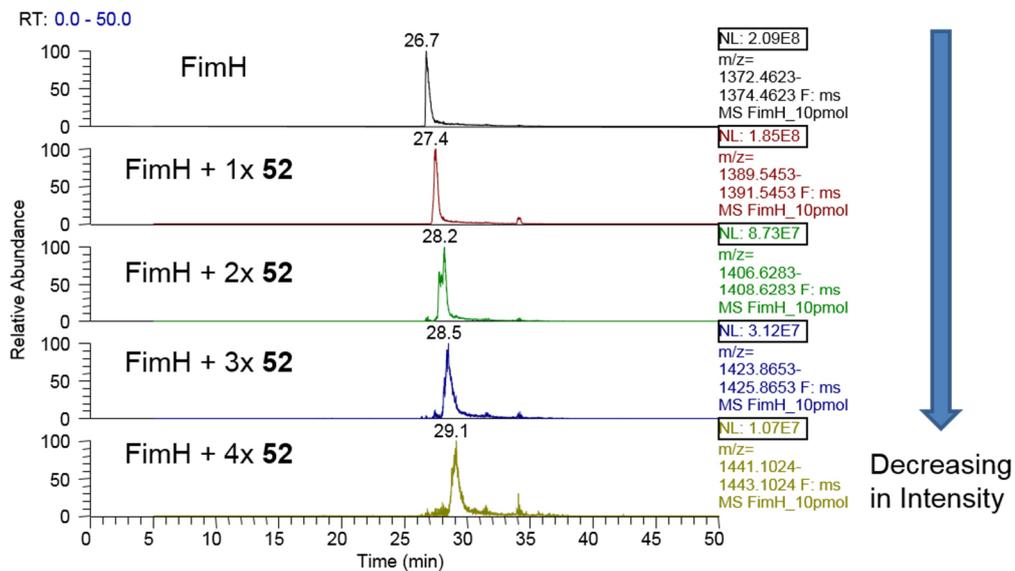


Abb. 104: LC-MS-Spektrum der modifizierten FimH_{tr}-Mischung nach der Reaktion von 51 und 52.

Tab. 14: Auflistung der Peptidfragmente, welche nach der enzymatischen Hydrolyse des modifizierten FimH_r mit Pepsin gefunden wurden und Markierung der modifizierten Aminosäuren (**FimH-V1**).

Amino Acid Start	Sequence	Amino Acid End	# PSMs	Modifications	Mod No. in Peptide	Mod No. in Protein	MH+ [Da]	Pepsin Ion Score	Trypsin Ion Score
1	FACKTANGTAIPIGGGSAN	19	2				1749,85759	70	
1	FACKTANGTAIPIGGGSAN V	20	1				1848,92778	47	
1	FACKTANGTAIPIGGGSAN VY	21	1				2011,98967	51	
4	KTANGTAIPIGGGSAN	19	1				1428,74431	57	
4	KTANGTAIPIGGGSANV	20	1				1527,81279	47	
4	KTANGTAIPIGGGSANVY	21	2				1690,87493	73	
9	TAIPIGGGSANVY	21	2				1219,63323	41	
11	IPIGGGSANV	20	2				884,48387	50	
21	YVNLAPVVN	29	2				988,54698	61	
21	YVNLAPVVNV	30	1				1087,61492	44	
21	YVNLAPVVNVGQN	33	4				1386,73882	56	
21	YVNLAPVVNVGQNL	34	2				1499,82305	46	
22	VNLAPVVNV	30	1				924,55168	31	
22	VNLAPVVNVGQN	33	6				1223,67441	64	
22	VNLAPVVNVGQNL	34	6				1336,75884	52	
22	VNLAPVVNVGQNLV	35	1				1435,82744	33	
25	APVVNVGQN	33	4				897,47905	67	
25	APVVNVGQNL	34	5				1010,56377	61	
25	APVVNVGQNLV	35	1				1109,63188	72	
26	PVVNVGQNL	34	4				939,52678	49	
26	PVVNVGQNLV	35	1				1038,5949	34	
45	HNDYPETITD	54	3				1204,51164	52	
45	HNDYPETITDY	55	1				1367,5761	43	
54	DYVTLQRGSAYGGVL	68	1				1598,81743	86	
55	YVTLQRGSAY	64	1				1157,59514	45	
55	YVTLQRGSAYG	65	1				1214,61736	49	
55	YVTLQRGSAYGGVL	68	30				1483,79094	67	
55	YVTLQRGSAYGGVLS	69	1				1570,82353	47	
55	YVTLQRGSAYGGVLSN	70	3				1684,86724	64	
55	YVTLQRGSAYGGVLSNF	71	3				1831,93511	62	
56	VTLQRGSAYGGV	67	1				1207,64214	65	
56	VTLQRGSAYGGVL	68	21				1320,72795	61	
56	VTLQRGSAYGGVLS	69	1				1407,7592	40	
56	VTLQRGSAYGGVLSN	70	3				1521,80071	63	
56	VTLQRGSAYGGVLSNF	71	3				1668,87139	74	
56	VTLQRGSAYGGVLSNFSG	73	2				1812,92571	44	
58	LQRGSAYGGVL	68	1				1120,6104	54	

ANHANG

58	LQRGSAYGGVLSN	70	2				1321,68389	66	
58	LQRGSAYGGVLSNF	71	1				1468,75493	45	
59	QRGSAYGGVL	68	1				1007,52733	39	
59	QRGSAYGGVLSN	70	2				1208,60295	61	
59	QRGSAYGGVLSNF	71	2				1355,6707	47	
59	QRGSAYGGVLSNFSG	73	2				1499,72356	46	
59	QRGSAYGGVLSNFSGT	74	1				1600,77031	45	
59	QRGSAYGGVLSNFSGTVK YSGSSYPFPTTSE	89	1				3231,52585	55	
61	GSAYGGVLSNFSGTVK	76	74				1543,77556		82
61	GSAYGGVLSNFSGTVK	76	1	S2 (52)	2	62	1765,85491		31
61	GSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPR	92	1	K16 (52)	16	76	3523,64536		55
69	SNFSGTVKYSGS	80	2				1233,57512	45	
69	SNFSGTVKYSGSS	81	2				1320,60674	47	
69	SNFSGTVKYSGSSYPFPTT	87	3				2026,94011	58	
69	SNFSGTVKYSGSSYPFPTTSE	89	2				2243,01665	48	
69	SNFSGTVKYSGSSYPFPTTSET	90	3				2344,06352	55	
69	SNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPRV	93	1				2696,28513	49	
71	FSGTVKYSGSSYPFPTTSE	89	1				2041,94158	47	
71	FSGTVKYSGSSYPFPTTSET	90	1				2142,98784	44	
72	SGTVKYSGSSYPFPTT	87	2				1678,79558	40	
72	SGTVKYSGSSYPFPTTSE	89	1				1894,87102	59	
72	SGTVKYSGSSYPFPTTSET	90	1				1995,91875	41	
72	SGTVKYSGSSYPFPTTSETPRV RVVY	95	3				2610,27422	59	
74	TVKYSGSSYPFPTTSET	90	2				1851,86626	56	
74	TVKYSGSSYPFPTTSETPRV VY	95	1				2466,21933	51	
75	VKYSGSSYPFPTT	87	1				1433,6917	41	
75	VKYSGSSYPFPTTSE	89	3				1649,7708	44	
75	VKYSGSSYPFPTTSET	90	1				1750,81377	48	
75	VKYSGSSYPFPTTSETPRV	93	3				2103,03806	49	
75	VKYSGSSYPFPTTSETPRV VY	95	5				2365,17339	67	
76	KYSGSSYPFPTTSET	90	2				1651,74968	50	
77	YSGSSYPFPTTSETPR	92	89				1776,80864		80
82	YPFPTTSETPRVY	95	2				1656,82903	59	
88	SETPRVY	95	1				950,49468	37	
90	TPRVY	95	2				734,42027	30	
91	PRVY	95	11				633,37151	32	
91	PRVYNSRTD	100	2				1206,62322	43	
94	VYNSRTDKPWPVAL	107	1				1645,8698	41	
96	NSRTDKPWPVA	106	3				1270,65434	39	
96	NSRTDKPWPVAL	107	1				1383,73821	39	

99	TDKPWPVALYLTPVSSAG GVAIK	121	7				2370,30815		89
99	TDKPWPVALYLTPVSSAG GVAIK	121	1	K3 (52)	3	101	2592,38852		22
101	KPWPVAL	107	3				810,48839	39	
107	LYLTPVSSAGG	117	1				1064,5634	36	
107	LYLTPVSSAGGVAIKAG	123	1	K15 (52)	15	121	1826,00188	51	
107	LYLTPVSSAGGVAIKAGSL	125	8				1804,02141	96	
108	YLTPVSSAGGVAIKA	122	1				1433,799	52	
108	YLTPVSSAGGVAIKAG	123	1				1490,82097	59	
108	YLTPVSSAGGVAIKAG	123	3	K14 (52)	14	121	1712,91509	44	
108	YLTPVSSAGGVAIKAGSL	125	65				1690,94341	111	
108	YLTPVSSAGGVAIKAGSLI A	127	3				1875,05913	60	
109	LTPVSSAGGVAIKAGSL	125	1				1527,87554	70	
110	TPVSSAGGVAIKAGSL	125	2				1414,7896	74	
111	PVSSAGGVAIKAGSL	125	1				1313,74333	63	
114	SAGGVAIKAGSL	125	2				1030,58635	48	
114	SAGGVAIKAGSLIA	127	1				1214,71135	35	
118	VAIKAGSL	125	2				758,47698	32	
122	AGSLIAVLILR	132	6				1125,73589	21	63
126	IAVLILRQTNNYNSDDFQ	143	2				2124,07622	69	
128	VLILRQTNNY	137	1				1233,69548	32	
128	VLILRQTNNYNSD	140	2				1549,79692	77	
128	VLILRQTNNYNSDD	141	1				1664,82256	51	
128	VLILRQTNNYNSDDFQ	143	2				1939,95122	105	
129	LILRQTNNY	137	2				1134,6281	33	
129	LILRQTNNYNSD	140	1				1450,72734	64	
129	LILRQTNNYNSDD	141	2				1565,75591	63	
129	LILRQTNNYNSDDF	142	1				1712,82366	62	
129	LILRQTNNYNSDDFQ	143	5				1840,88408	72	
130	ILRQTNNY	137	2				1021,54411	38	
130	ILRQTNNYNSD	140	2				1337,64592	53	
130	ILRQTNNYNSDD	141	6				1452,67119	62	
130	ILRQTNNYNSDD	141	1	Y8 (52)	8	137	1674,75078	43	
130	ILRQTNNYNSDDF	142	2				1599,7404	64	
130	ILRQTNNYNSDDFQ	143	80				1727,7979	96	
131	LRQTNNYNSDDFQ	143	1				1614,71514	53	
132	RQTNNYNSDD	141	1	Y6 (52)	6	137	1448,58452	38	
132	RQTNNYNSDDF	142	1				1373,57182	57	
132	RQTNNYNSDDFQ	143	15				1501,63249	74	
144	FVWNIYANN	152	1				1140,54778	45	
145	VWNIYANND	153	1				1108,50664	37	
153	DVVVPTGGHHH	163	1				1154,57085	44	
153	DVVVPTGGHHHHHH	166	6				1565,74785	74	

154	VVVPTGGHHHHHHH	166	5				1450,71965	76	
156	VPTGGHHHHHHH	166	1				1252,58	52	
157	PTGGHHHHHHH	166	5				1153,51164	43	

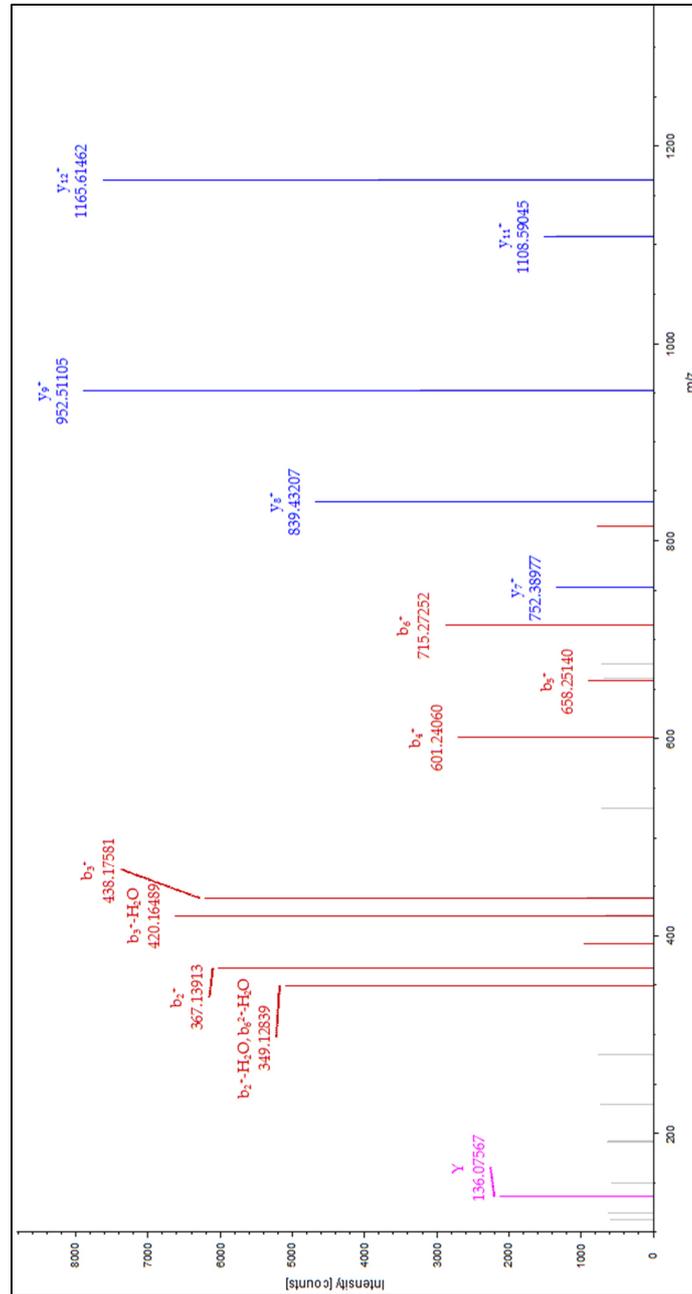


Abb. 105: MS/MS-Spektrum aus der Datenbank für das Peptidfragment GSAYGGVLSNFSGTVK. Die Modifikation wurde hierdurch an S2 identifiziert (**FimH-V1**).

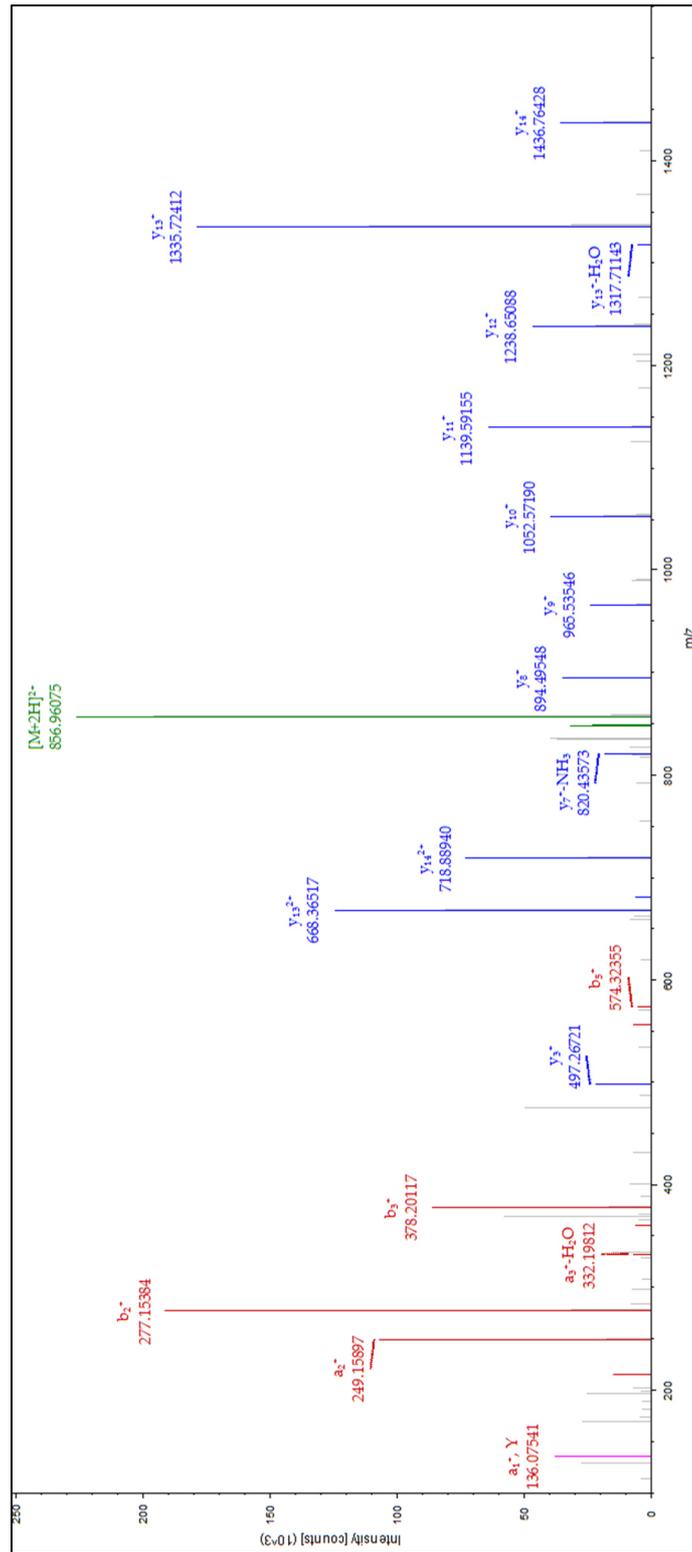


Abb. 106: MS/MS-Spektrum aus der Datenbank für das Peptidfragment YLTPVSSAGGVAIKAG. Die Modifikation wurde an K14 identifiziert (**FimH-V1**).

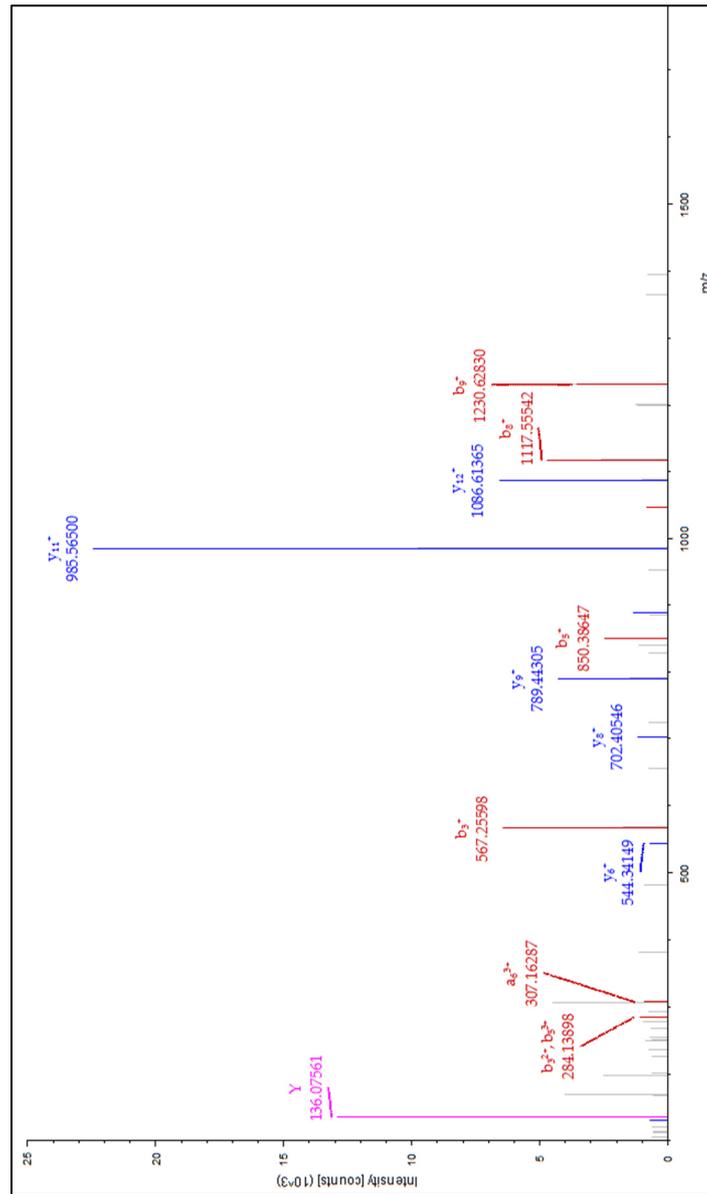


Abb. 107: MS/MS-Spektrum aus der Datenbank für das Peptidfragment TDKPWPVALYLTPVSSAGGVAIK. Die Modifikation wurde an K3 identifiziert (**FimH-V1**).

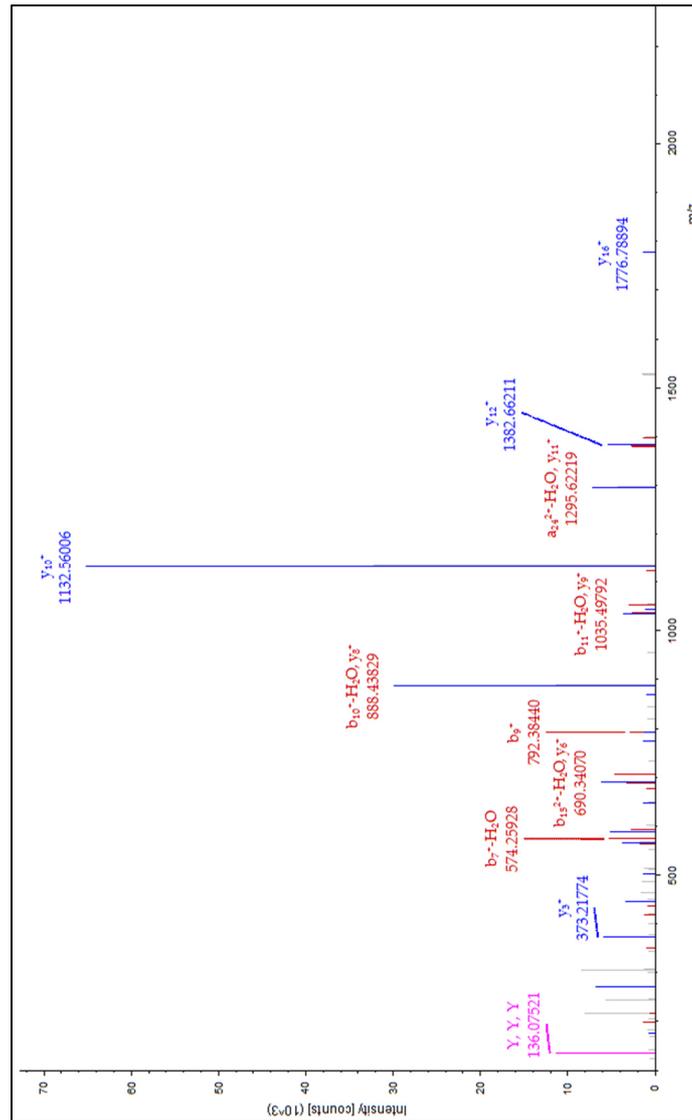


Abb. 108: MS/MS-Spektrum aus der Datenbank für das Peptidfragment GSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYPFPTTSETPR. Die Modifikation wurde an K16 identifiziert (**FimH-V1**).

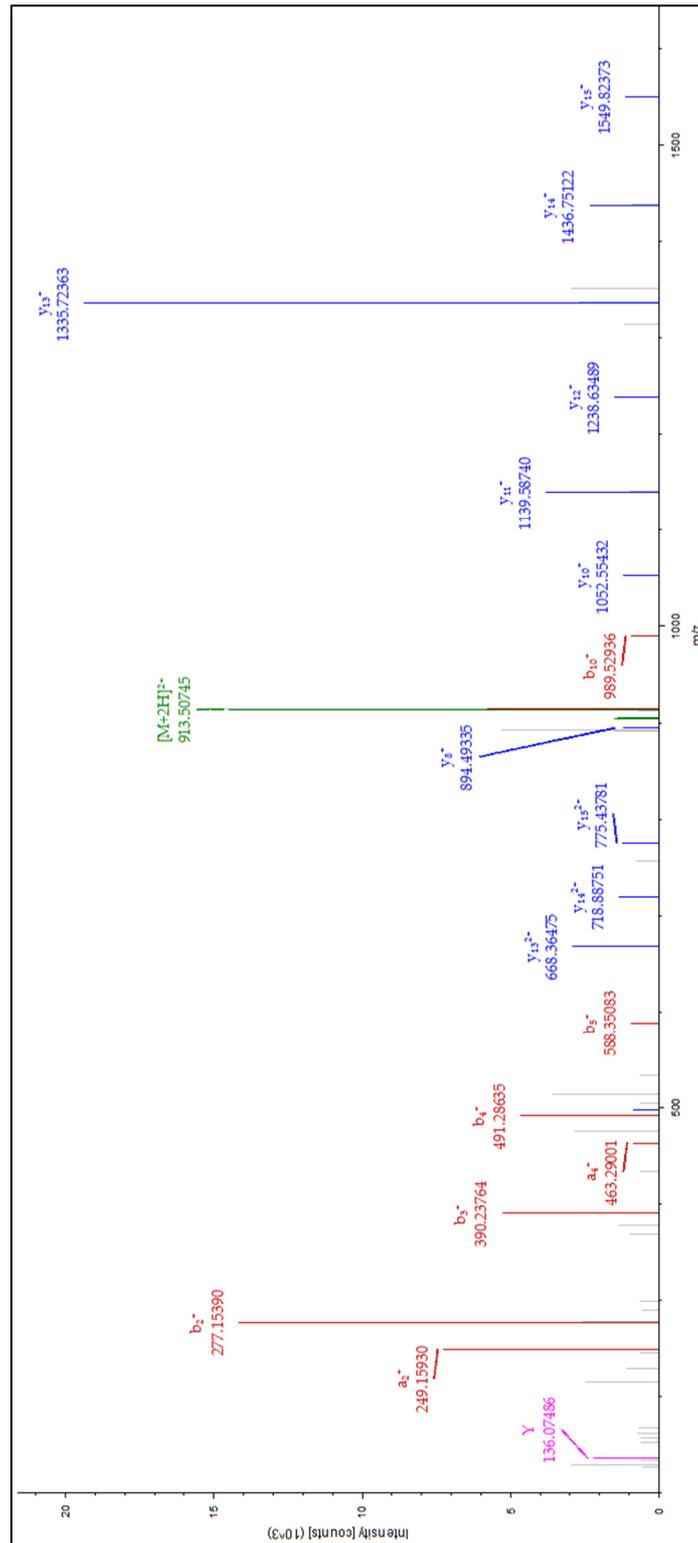


Abb. 109: MS/MS-Spektrum aus der Datenbank für das Peptidfragment LYLTPVSSAGGVAIKAG. Die Modifikation wurde an K15 identifiziert (**FimH-V1**).

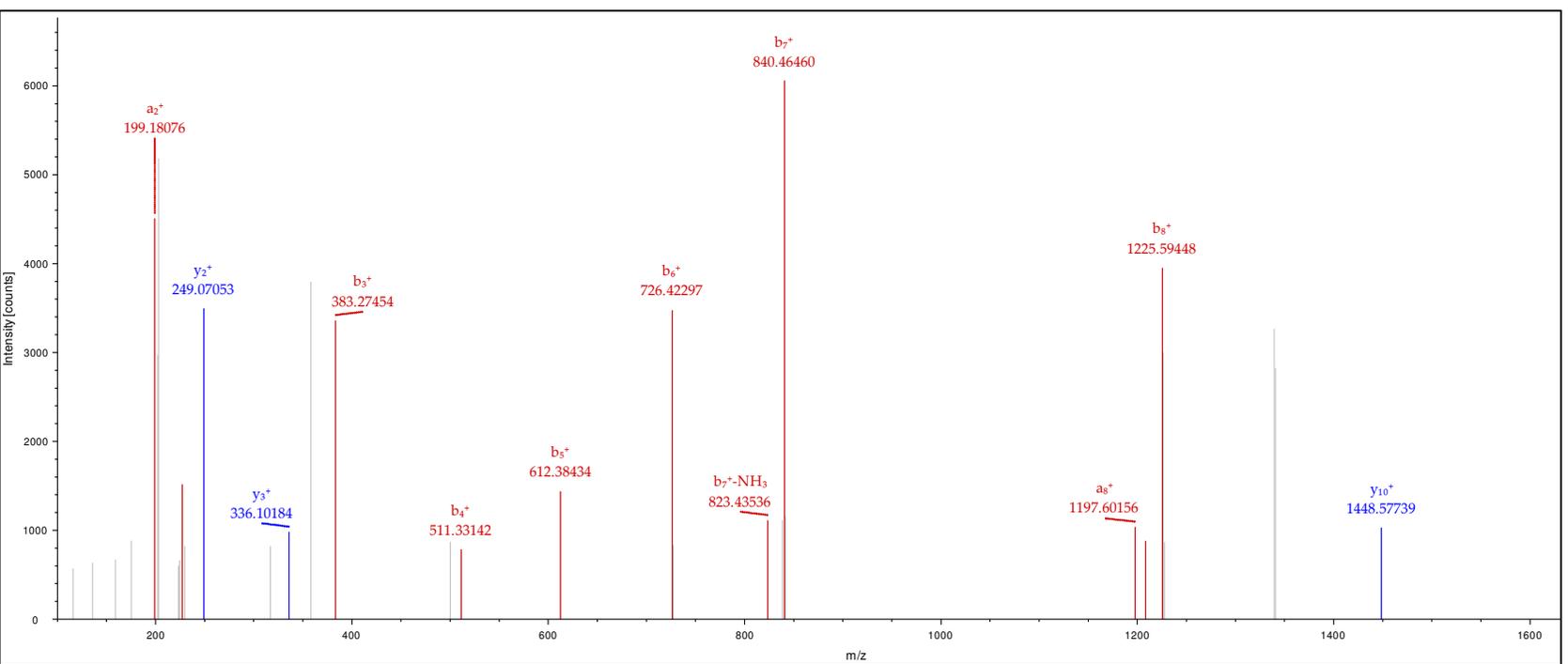


Abb. 110: MS/MS-Spektrum aus der Datenbank für das Peptidfragment ILRQTNNYNSDD. Die Modifikation wurde an Y8 identifiziert (FimH-V1).

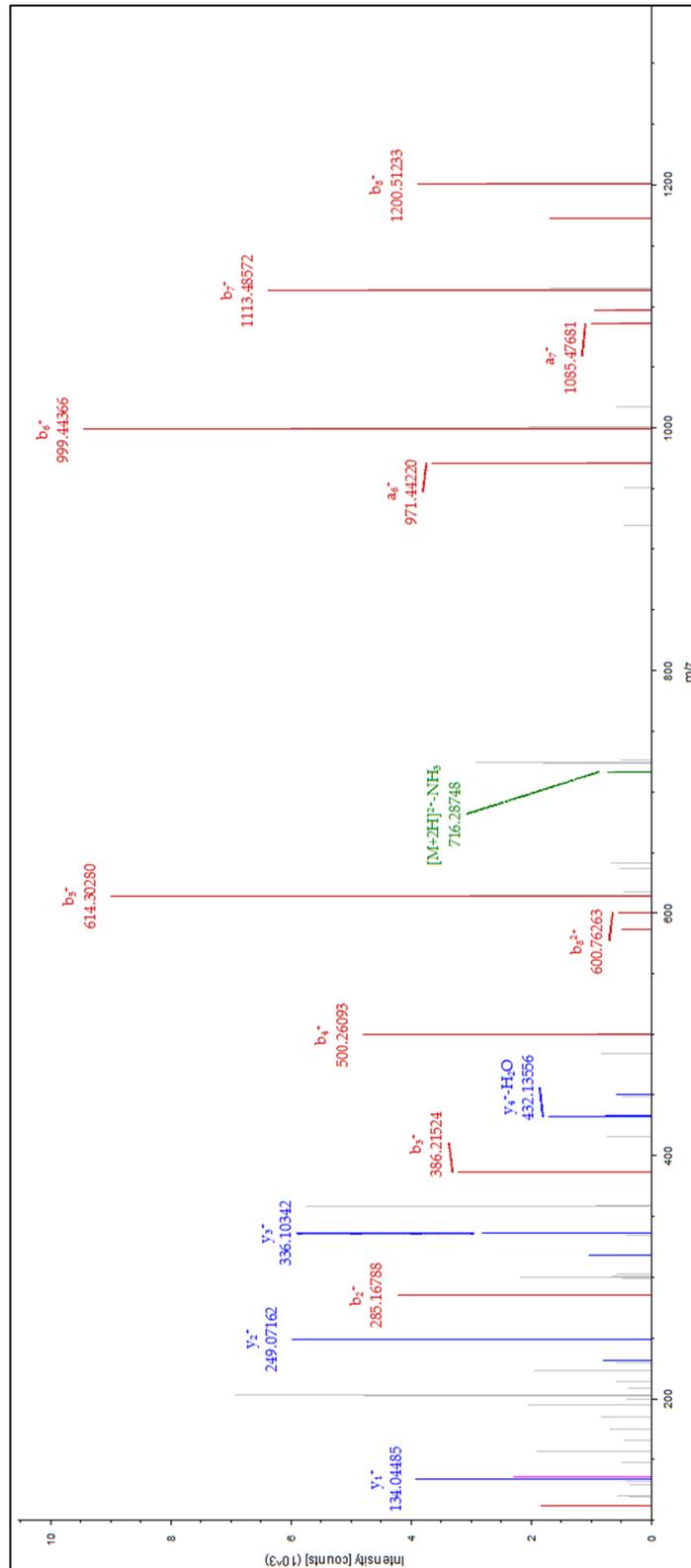


Abb. 111: MS/MS-Spektrum aus der Datenbank für das Peptidfragment RQTNNYNSDD. Die Modifikation wurde an Y6 identifiziert (**FimH-V1**),

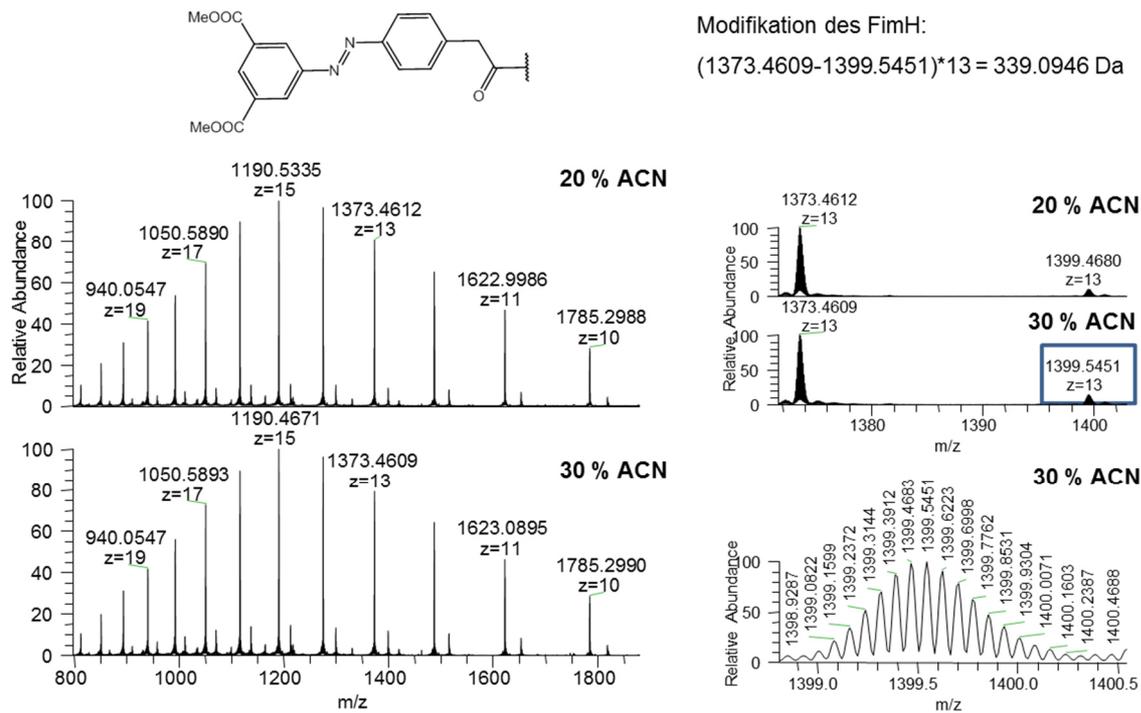


Abb. 112: ESI-MS-Spektren von FimH_{tr} nach Reaktion mit **51** und **53** in HEPES-Puffer (pH-Wert = 8) in 20 bzw. 30 % ACN.

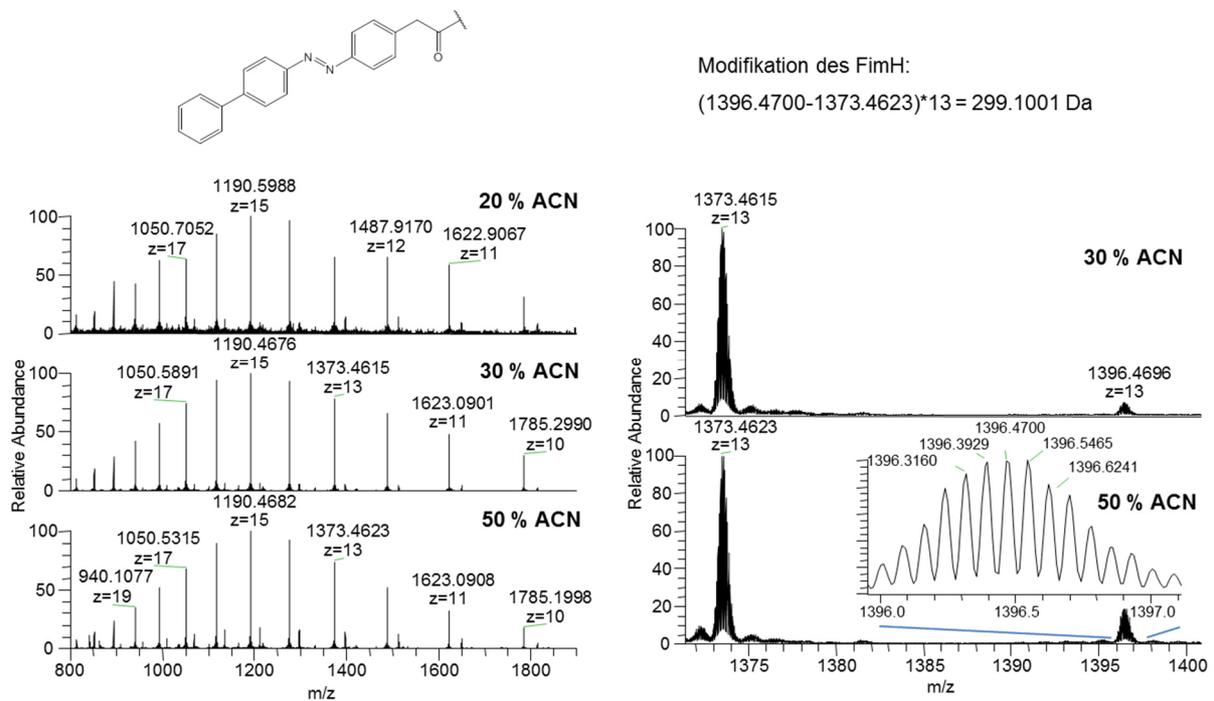


Abb. 113: ESI-MS-Spektren von FimH_{tr} nach Reaktion mit **51** und **54** in HEPES-Puffer (pH-Wert = 8) in 20, 30 bzw. 50 % ACN.

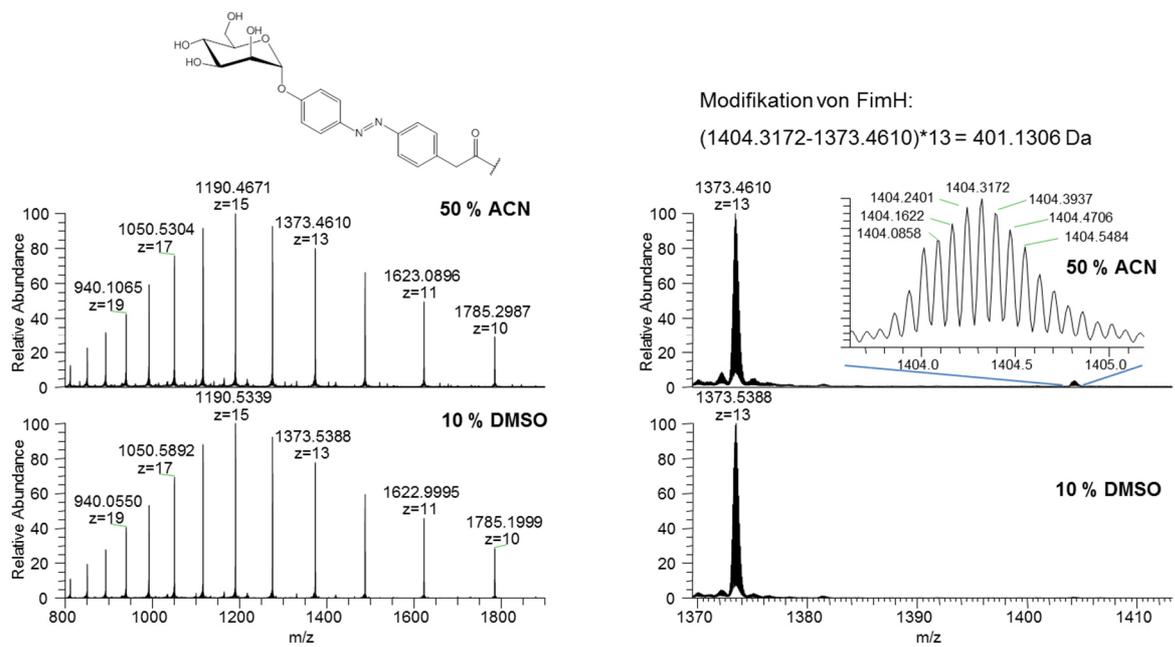


Abb. 114: ESI-MS-Spektren von FimH_{tr} nach Reaktion mit **51** und **76** in HEPES-Puffer (pH-Wert = 8) in 20, 30 bzw. 50 % ACN.

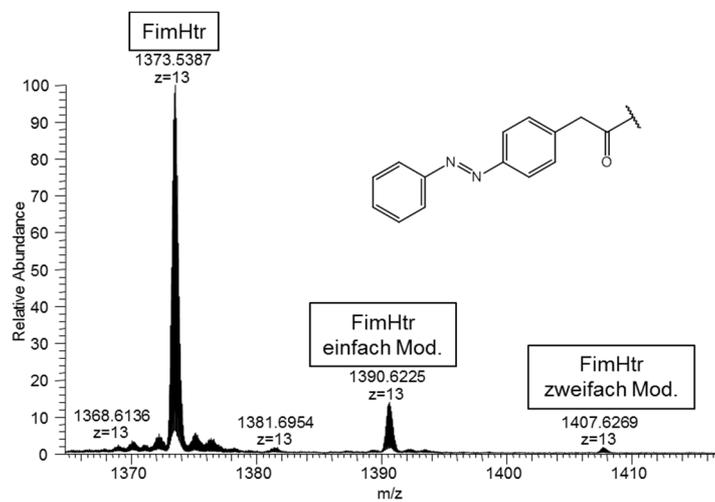


Abb. 115: ESI-MS-Spektrum des FimH_{tr} nach DMAP-Ligationsreaktion mit Thioester **52** und DMAP-Ligand **51** in 30 % ACN (**FimH-V3**).

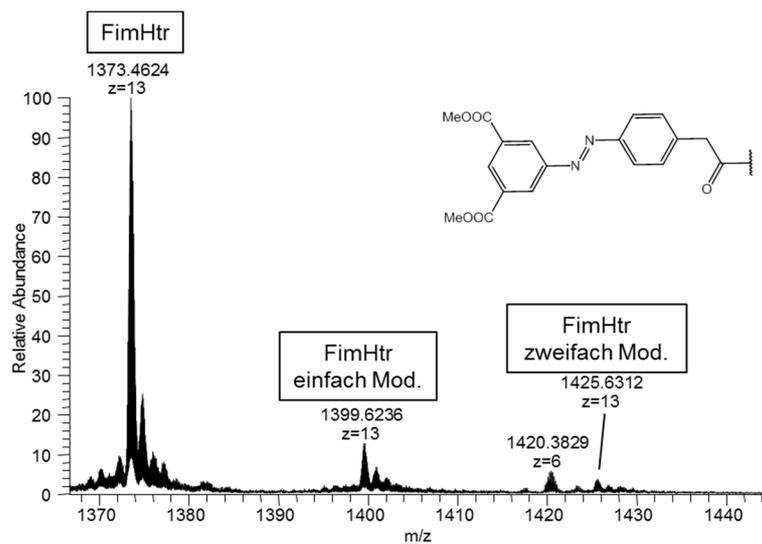


Abb. 116: ESI-MS-Spektrum des FimH_{tr} nach DMAP-Ligationsreaktion mit Thioester **53** und DMAP-Ligand **51** in 30 % ACN (**FimH-V4**).

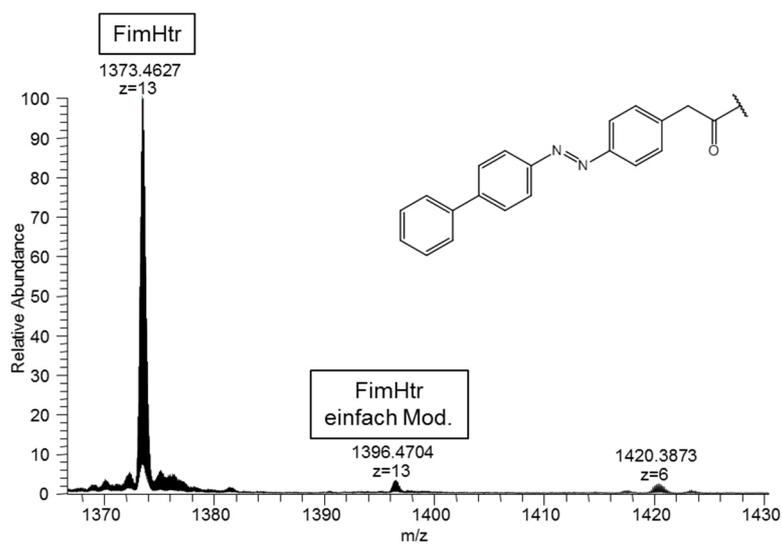


Abb. 117: ESI-MS-Spektrum von FimH_{tr} nach DMAP-Ligationsreaktion mit Thioester **54** und DMAP-Ligand **51** in 30 % ACN (**FimH-V5**).

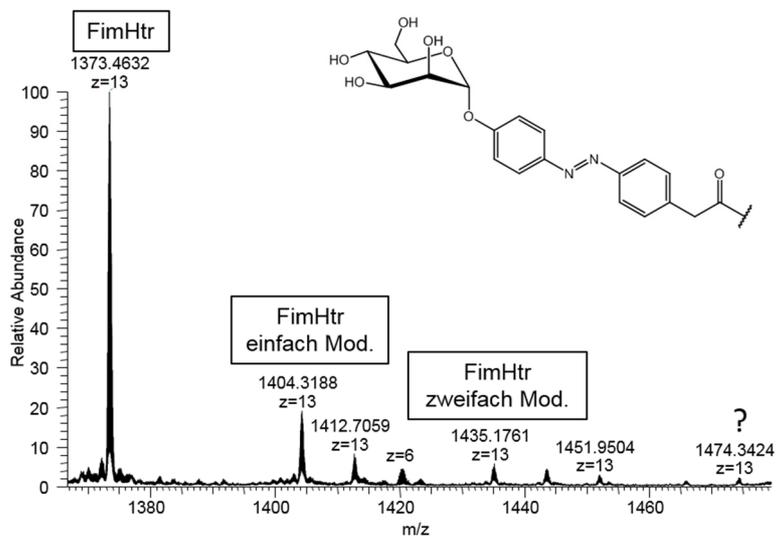


Abb. 118: ESI-MS-Spektrum von FimH_{tr} nach DMAP-Ligationsreaktion mit Thioester **76** und DMAP-Ligand **51** in 10 % DMSO (**FimH-V6**).

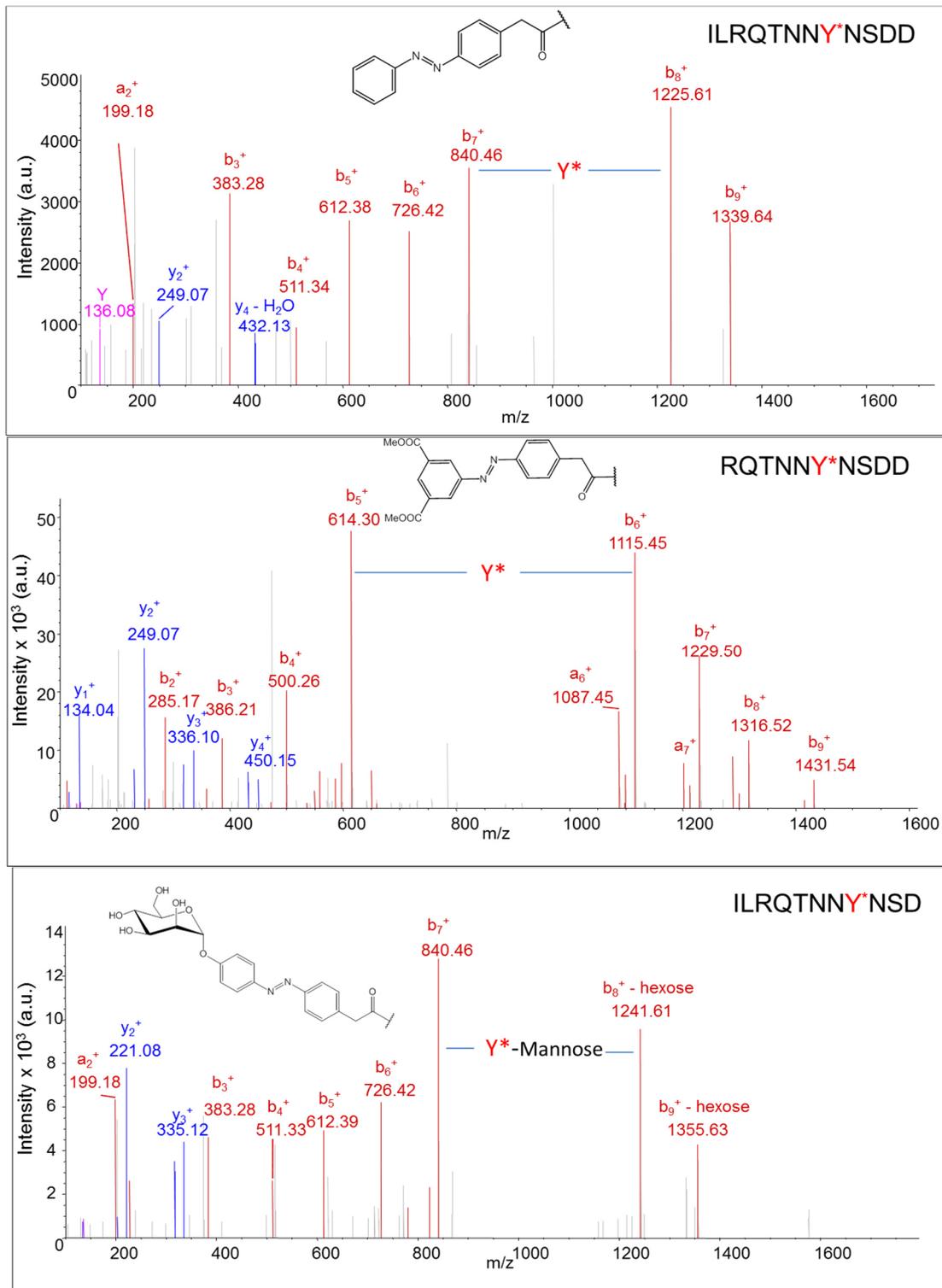


Abb. 119: MS/MS-Spektren (Datenbank) der FimH-Versuche **V3**, **V4**, **V6**. Die Thioestermodifikation wurde in allen Fällen am TYR137 identifiziert.

6.2 Durchgeführte Rechnungen

3D-Strukturen

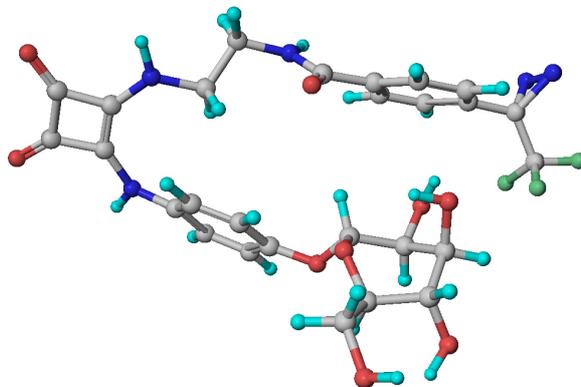


Abb. 120: 3D-Struktur Ligand 5.

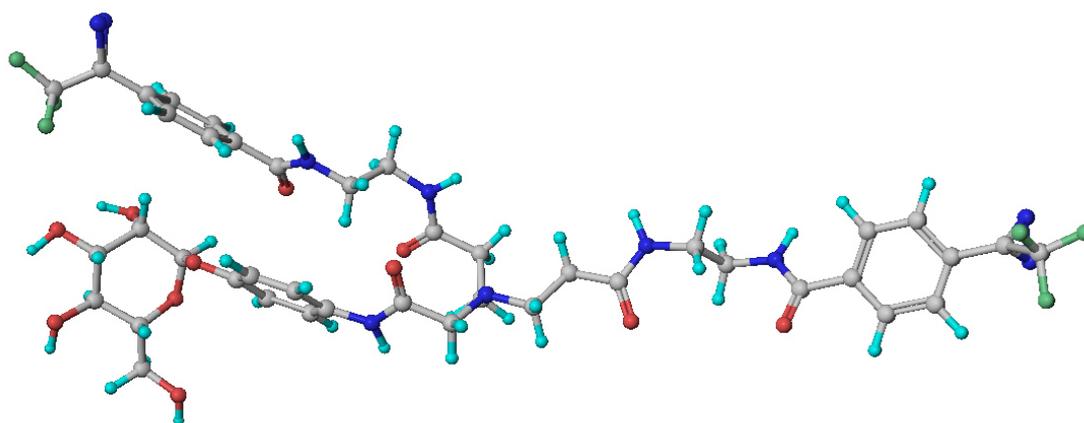


Abb. 121: 3D-Struktur Ligand 6.

6.2.1 Docking mit FlexX (Sybyl)

Tab. 15: Docking-Ergebnis für Ligand 4 in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

No.	Total Score	Match-Score	Lipo-Score	Ambig-Score	Clash-Score	Rot-Score	RMS-Value	Simil. Index	#Match	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.
1	-36.173	-40.551	-9.784	-8.910	2.271	15.400	0.000	-1.000	21	0.058	0.470	1
2	-36.144	-40.551	-9.678	-8.986	2.271	15.400	1.368	-1.000	21	0.058	0.470	1
3	-36.083	-40.551	-9.793	-9.218	2.679	15.400	1.322	-1.000	21	0.069	0.470	1
4	-35.976	-39.014	-10.173	-8.609	1.021	15.400	1.548	-1.000	23	0.021	0.275	1
5	-35.938	-39.014	-10.135	-8.609	1.021	15.400	1.573	-1.000	23	0.021	0.275	1
6	-35.794	-40.366	-9.582	-8.534	1.887	15.400	2.625	-1.000	23	0.047	0.454	1
7	-35.794	-40.366	-9.582	-8.534	1.887	15.400	2.845	-1.000	23	0.047	0.454	1
8	-35.794	-40.366	-9.582	-8.534	1.887	15.400	2.818	-1.000	23	0.047	0.454	1
9	-35.794	-40.366	-9.582	-8.534	1.887	15.400	2.897	-1.000	23	0.047	0.454	1
10	-35.794	-40.366	-9.582	-8.534	1.887	15.400	2.895	-1.000	23	0.047	0.454	1
11	-35.715	-39.014	-9.912	-8.609	1.021	15.400	1.709	-1.000	23	0.021	0.275	1
12	-35.672	-40.551	-9.501	-8.846	2.426	15.400	0.439	-1.000	21	0.061	0.470	1
13	-35.652	-40.477	-9.382	-9.437	2.845	15.400	1.379	-1.000	21	0.098	1.788	1
14	-35.642	-39.014	-9.840	-8.609	1.021	15.400	1.620	-1.000	23	0.021	0.275	1
15	-35.545	-39.014	-9.742	-8.609	1.021	15.400	1.777	-1.000	23	0.021	0.275	1
16	-35.545	-39.014	-9.742	-8.609	1.021	15.400	1.776	-1.000	23	0.021	0.275	1
17	-35.358	-40.514	-9.559	-8.329	2.244	15.400	2.865	-1.000	23	0.057	0.548	1
18	-35.358	-40.514	-9.559	-8.329	2.244	15.400	2.868	-1.000	23	0.057	0.548	1
19	-35.358	-40.514	-9.559	-8.329	2.244	15.400	2.727	-1.000	23	0.057	0.548	1
20	-35.358	-40.514	-9.559	-8.329	2.244	15.400	2.623	-1.000	23	0.057	0.548	1
21	-35.358	-40.514	-9.559	-8.329	2.244	15.400	2.682	-1.000	23	0.057	0.548	1
22	-35.358	-40.514	-9.559	-8.329	2.244	15.400	2.642	-1.000	23	0.057	0.548	1
23	-35.358	-40.514	-9.559	-8.329	2.244	15.400	2.757	-1.000	23	0.057	0.548	1
24	-35.292	-40.477	-9.388	-9.071	2.845	15.400	0.446	-1.000	21	0.098	1.788	1
25	-35.267	-40.551	-9.382	-8.817	2.682	15.400	1.152	-1.000	21	0.074	0.612	1
26	-35.098	-40.779	-9.353	-8.310	2.545	15.400	2.548	-1.000	23	0.069	0.583	1
27	-35.098	-40.779	-9.353	-8.310	2.545	15.400	2.623	-1.000	23	0.069	0.583	1
28	-35.098	-40.779	-9.353	-8.310	2.545	15.400	2.859	-1.000	23	0.069	0.583	1
29	-35.098	-40.779	-9.353	-8.310	2.545	15.400	2.810	-1.000	23	0.069	0.583	1
30	-35.098	-40.779	-9.353	-8.310	2.545	15.400	2.815	-1.000	23	0.069	0.583	1

Tab. 16: Docking-Ergebnis für Ligand **4** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

No.	Total Score	Match-Score	Lipo-Score	Ambig-Score	Clash-Score	Rot-Score	RMS-Value	Simil. Index	#Match	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.
1	-34.647	-39.761	-9.693	-8.640	2.647	15.400	0.000	-1.000	26	0.112	1.602	1
2	-33.226	-37.598	-8.577	-9.678	1.827	15.400	6.162	-1.000	26	0.046	0.569	1
3	-33.176	-37.598	-8.527	-9.678	1.827	15.400	6.248	-1.000	26	0.046	0.569	1
4	-33.020	-37.598	-8.315	-9.735	1.827	15.400	5.972	-1.000	26	0.046	0.569	1
5	-32.964	-37.598	-8.315	-9.678	1.827	15.400	6.109	-1.000	26	0.046	0.569	1
6	-32.964	-37.598	-8.315	-9.678	1.827	15.400	5.951	-1.000	26	0.046	0.569	1
7	-32.764	-36.292	-9.597	-9.771	2.096	15.400	1.342	-1.000	24	0.047	0.451	1
8	-32.572	-38.511	-7.913	-9.298	2.350	15.400	5.782	-1.000	27	0.075	1.125	1
9	-32.563	-38.511	-7.913	-9.289	2.350	15.400	5.890	-1.000	27	0.075	1.125	1
10	-32.531	-38.511	-7.927	-9.242	2.350	15.400	6.065	-1.000	27	0.075	1.125	1
11	-32.516	-38.511	-7.913	-9.242	2.350	15.400	5.752	-1.000	27	0.075	1.125	1
12	-32.516	-38.511	-7.913	-9.242	2.350	15.400	5.832	-1.000	27	0.075	1.125	1
13	-32.516	-38.511	-7.913	-9.242	2.350	15.400	6.056	-1.000	27	0.075	1.125	1
14	-32.386	-36.675	-9.099	-9.459	2.047	15.400	1.709	-1.000	25	0.138	2.482	1
15	-32.294	-39.780	-8.495	-8.524	3.704	15.400	0.684	-1.000	26	0.172	1.602	1
16	-32.266	-38.085	-7.311	-9.092	1.421	15.400	5.614	-1.000	26	0.036	0.453	1
17	-32.266	-38.085	-7.311	-9.092	1.421	15.400	5.530	-1.000	26	0.036	0.453	1
18	-32.266	-38.085	-7.311	-9.092	1.421	15.400	5.358	-1.000	26	0.036	0.453	1
19	-32.266	-38.085	-7.311	-9.092	1.421	15.400	5.282	-1.000	26	0.036	0.453	1
20	-32.266	-38.085	-7.311	-9.092	1.421	15.400	5.552	-1.000	26	0.036	0.453	1
21	-31.942	-34.442	-10.266	-10.007	1.972	15.400	1.054	-1.000	26	0.094	1.148	1
22	-31.858	-38.086	-7.077	-8.915	1.420	15.400	5.747	-1.000	26	0.036	0.449	1
23	-31.858	-38.086	-7.077	-8.915	1.420	15.400	5.409	-1.000	26	0.036	0.449	1
24	-31.858	-38.086	-7.077	-8.915	1.420	15.400	5.768	-1.000	26	0.036	0.449	1
25	-31.858	-38.086	-7.077	-8.915	1.420	15.400	5.682	-1.000	26	0.036	0.449	1
26	-31.858	-38.086	-7.077	-8.915	1.420	15.400	5.444	-1.000	26	0.036	0.449	1
27	-31.699	-37.118	-9.878	-9.024	3.520	15.400	1.395	-1.000	27	0.217	2.313	1
28	-31.509	-37.129	-9.331	-8.880	3.031	15.400	1.520	-1.000	26	0.174	1.931	1
29	-31.498	-36.154	-9.496	-9.574	2.926	15.400	2.075	-1.000	24	0.140	1.522	1
30	-31.495	-36.389	-10.392	-8.883	3.368	15.400	0.738	-1.000	23	0.131	2.344	1

Tab. 17: Docking-Ergebnis für Ligand **5** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

No.	Total Score	Match-Score	Lipo-Score	Ambig-Score	Clash-Score	Rot-Score	RMS-Value	Simil. Index	#Match	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.
1	-34.007	-41.701	-9.500	-11.718	2.512	21.000	0.000	-1.000	19	0.065	0.693	1
2	-33.392	-43.004	-9.241	-9.394	1.847	21.000	2.252	-1.000	19	0.051	0.934	1

3	-33.019	-42.402	-8.061	-11.370	2.414	21.000	0.643	-1.000	20	0.070	0.600	1
4	-32.822	-41.946	-9.149	-9.281	1.155	21.000	2.192	-1.000	18	0.023	0.254	1
5	-32.773	-42.582	-8.053	-10.959	2.421	21.000	0.934	-1.000	19	0.076	1.255	1
6	-31.643	-41.302	-9.348	-9.527	2.134	21.000	1.792	-1.000	19	0.055	0.932	1
7	-31.556	-40.579	-9.847	-8.930	1.400	21.000	2.362	-1.000	19	0.042	1.092	1
8	-31.497	-40.667	-9.180	-9.497	1.447	21.000	1.739	-1.000	17	0.028	0.293	1
9	-31.380	-43.527	-8.169	-9.648	3.565	21.000	8.921	-1.000	19	0.147	2.043	1
10	-31.221	-41.305	-12.648	-11.694	8.026	21.000	1.242	-1.000	19	0.295	2.368	1
11	-31.127	-40.168	-8.793	-9.959	1.394	21.000	1.997	-1.000	15	0.032	0.269	1
12	-31.080	-40.830	-7.940	-11.088	2.379	21.000	9.858	-1.000	17	0.067	0.769	1
13	-30.914	-41.335	-11.747	-9.777	5.544	21.000	2.420	-1.000	18	0.218	1.922	1
14	-30.838	-42.753	-7.919	-10.563	3.997	21.000	0.971	-1.000	19	0.152	2.362	1
15	-30.742	-42.753	-7.919	-10.445	3.975	21.000	0.559	-1.000	19	0.151	2.362	1
16	-30.580	-41.441	-11.422	-10.337	6.220	21.000	9.605	-1.000	17	0.214	2.183	1
17	-30.452	-40.466	-8.120	-10.120	1.854	21.000	2.027	-1.000	17	0.072	1.525	1
18	-30.439	-40.507	-8.862	-9.655	2.186	21.000	1.829	-1.000	15	0.050	0.326	1
19	-30.401	-39.549	-9.470	-10.831	3.048	21.000	1.383	-1.000	20	0.085	1.006	1
20	-30.351	-39.137	-9.607	-8.655	0.649	21.000	2.306	-1.000	18	0.013	0.190	1
21	-30.299	-40.042	-8.945	-9.215	1.503	21.000	2.346	-1.000	15	0.042	0.675	1
22	-30.095	-39.784	-7.925	-11.212	2.425	21.000	1.681	-1.000	16	0.056	0.490	1
23	-30.073	-40.343	-8.472	-10.561	2.903	21.000	9.902	-1.000	17	0.092	1.028	1
24	-30.044	-41.035	-10.826	-11.505	6.923	21.000	1.386	-1.000	19	0.294	2.368	1
25	-29.830	-39.355	-8.958	-11.010	3.094	21.000	1.331	-1.000	19	0.083	0.919	1
26	-29.585	-40.752	-8.981	-9.494	3.242	21.000	2.651	-1.000	19	0.116	1.818	1
27	-29.465	-40.462	-8.133	-11.101	3.831	21.000	1.766	-1.000	17	0.126	1.761	1
28	-29.408	-40.683	-8.163	-9.645	2.683	21.000	1.817	-1.000	16	0.098	1.026	1
29	-29.331	-38.858	-8.727	-10.216	2.069	21.000	2.206	-1.000	15	0.086	1.358	1
30	-29.269	-39.784	-7.624	-10.411	2.150	21.000	1.710	-1.000	16	0.050	0.490	1

Tab. 18: Docking-Ergebnis für Ligand **5** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

No.	Total Score	Match-Score	Lipo-Score	Ambig-Score	Clash-Score	Rot-Score	RMS-Value	Simil. Index	#Match	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.
1	-28.588	-35.622	-11.769	-10.314	2.718	21.000	0.000	-1.000	24	0.104	2.398	1
2	-28.194	-36.336	-12.283	-10.873	4.898	21.000	7.054	-1.000	21	0.165	1.704	1
3	-27.964	-34.564	-12.975	-12.798	5.973	21.000	7.108	-1.000	20	0.240	2.182	1
4	-27.373	-35.339	-11.594	-9.698	2.857	21.000	6.787	-1.000	20	0.113	2.366	1
5	-27.271	-37.125	-10.907	-9.612	3.973	21.000	7.037	-1.000	23	0.155	2.202	1
6	-27.095	-37.125	-10.918	-9.426	3.973	21.000	6.990	-1.000	23	0.155	2.202	1
7	-27.010	-33.798	-12.394	-9.703	2.484	21.000	5.265	-1.000	22	0.118	2.130	1
8	-26.857	-34.939	-10.944	-10.170	2.797	21.000	6.713	-1.000	24	0.109	2.296	1
9	-26.706	-36.674	-10.570	-9.600	3.739	21.000	7.027	-1.000	23	0.150	2.202	1

10	-26.566	-34.820	-13.214	-10.866	5.934	21.000	7.143	-1.000	22	0.225	2.258	1
11	-26.535	-33.429	-11.574	-10.230	2.298	21.000	6.596	-1.000	23	0.091	2.235	1
12	-26.468	-33.487	-11.410	-10.230	2.258	21.000	6.590	-1.000	22	0.091	2.244	1
13	-26.455	-36.674	-10.592	-9.328	3.739	21.000	7.100	-1.000	23	0.150	2.202	1
14	-26.308	-36.674	-10.422	-9.351	3.739	21.000	6.942	-1.000	23	0.150	2.202	1
15	-26.248	-33.203	-11.586	-10.671	2.811	21.000	6.149	-1.000	22	0.102	2.317	1
16	-26.245	-33.257	-11.898	-10.454	2.964	21.000	0.883	-1.000	22	0.109	2.398	1
17	-26.200	-37.125	-10.412	-9.035	3.973	21.000	6.975	-1.000	23	0.155	2.202	1
18	-26.194	-37.125	-10.412	-9.030	3.973	21.000	7.222	-1.000	23	0.155	2.202	1
19	-26.194	-37.125	-10.412	-9.030	3.973	21.000	7.210	-1.000	23	0.155	2.202	1
20	-26.147	-32.708	-13.612	-9.562	3.335	21.000	4.843	-1.000	21	0.121	2.130	1
21	-26.114	-35.216	-12.093	-10.933	5.728	21.000	6.352	-1.000	21	0.199	2.225	1
22	-25.991	-33.018	-11.516	-10.771	2.914	21.000	6.132	-1.000	21	0.103	2.307	1
23	-25.822	-36.674	-10.252	-9.035	3.739	21.000	7.218	-1.000	23	0.150	2.202	1
24	-25.822	-36.674	-10.252	-9.035	3.739	21.000	7.193	-1.000	23	0.150	2.202	1
25	-25.822	-36.674	-10.252	-9.035	3.739	21.000	7.003	-1.000	23	0.150	2.202	1
26	-25.810	-33.429	-11.219	-9.859	2.298	21.000	6.384	-1.000	23	0.091	2.235	1
27	-25.794	-33.203	-11.030	-10.420	2.458	21.000	6.406	-1.000	22	0.095	2.317	1
28	-25.777	-33.490	-11.198	-10.465	2.976	21.000	6.620	-1.000	16	0.122	2.187	1
29	-25.777	-33.490	-11.198	-10.465	2.976	21.000	6.556	-1.000	16	0.122	2.187	1
30	-25.777	-33.490	-11.198	-10.465	2.976	21.000	6.887	-1.000	16	0.122	2.187	1

Tab. 19: Docking-Ergebnis für Ligand **6** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

No.	Total Score	Match-Score	Lipo-Score	Ambig-Score	Clash-Score	Rot-Score	RMS-Value	Simil. Index	#Match	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.
1	-32.364	-50.580	-12.804	-12.357	2.977	35.000	0.000	-1.000	28	0.053	0.652	1
2	-32.357	-50.580	-13.096	-12.091	3.009	35.000	0.264	-1.000	28	0.053	0.652	1
3	-31.849	-51.062	-12.518	-12.411	3.743	35.000	1.164	-1.000	28	0.062	0.668	1
4	-31.836	-51.241	-12.182	-12.010	3.197	35.000	0.997	-1.000	28	0.055	0.642	1
5	-31.819	-51.062	-11.823	-12.753	3.418	35.000	1.623	-1.000	28	0.057	0.668	1
6	-31.791	-51.062	-11.823	-12.724	3.418	35.000	1.175	-1.000	28	0.057	0.668	1
7	-31.457	-51.241	-11.803	-12.010	3.197	35.000	0.996	-1.000	28	0.055	0.642	1
8	-31.450	-51.062	-11.823	-12.384	3.418	35.000	1.568	-1.000	28	0.058	0.668	1
9	-31.438	-49.970	-13.106	-12.493	3.731	35.000	0.514	-1.000	28	0.063	0.761	1
10	-31.283	-51.241	-11.629	-12.010	3.197	35.000	1.193	-1.000	28	0.055	0.642	1
11	-31.277	-50.580	-11.907	-12.167	2.977	35.000	1.016	-1.000	28	0.053	0.652	1
12	-31.269	-50.714	-12.405	-11.986	3.436	35.000	0.950	-1.000	28	0.059	0.627	1
13	-31.268	-50.580	-11.907	-12.158	2.977	35.000	0.880	-1.000	28	0.053	0.652	1
14	-31.255	-49.970	-13.327	-12.614	4.255	35.000	0.809	-1.000	28	0.079	1.200	1
15	-31.173	-51.241	-11.459	-12.071	3.197	35.000	1.298	-1.000	28	0.055	0.642	1
16	-31.116	-50.000	-12.876	-12.372	3.733	35.000	1.364	-1.000	29	0.064	0.524	1

17	-31.098	-50.000	-12.740	-12.459	3.700	35.000	1.610	-1.000	29	0.064	0.524	1
18	-31.012	-49.857	-12.206	-12.380	3.031	35.000	0.941	-1.000	28	0.053	0.629	1
19	-31.010	-50.714	-12.146	-11.986	3.436	35.000	0.941	-1.000	28	0.059	0.627	1
20	-30.836	-47.819	-13.583	-12.862	3.027	35.000	1.420	-1.000	26	0.077	1.477	1
21	-30.650	-49.970	-12.129	-12.556	3.605	35.000	1.110	-1.000	28	0.062	0.761	1
22	-30.611	-50.714	-11.653	-12.081	3.436	35.000	1.239	-1.000	28	0.059	0.627	1
23	-30.603	-50.714	-11.653	-12.072	3.436	35.000	1.344	-1.000	28	0.059	0.627	1
24	-30.559	-48.185	-12.505	-13.111	2.842	35.000	1.796	-1.000	27	0.083	2.265	1
25	-30.514	-49.857	-11.588	-12.500	3.031	35.000	1.436	-1.000	28	0.053	0.629	1
26	-30.511	-49.970	-12.128	-12.417	3.605	35.000	1.194	-1.000	28	0.062	0.761	1
27	-30.458	-50.000	-12.377	-12.539	4.059	35.000	1.598	-1.000	29	0.071	0.524	1
28	-30.354	-49.557	-11.452	-12.590	2.844	35.000	0.986	-1.000	27	0.047	0.536	1
29	-30.286	-49.023	-12.649	-12.419	3.406	35.000	0.574	-1.000	26	0.055	0.520	1
30	-30.070	-49.857	-11.588	-12.056	3.031	35.000	1.497	-1.000	28	0.053	0.629	1

Tab. 20: Docking-Ergebnis für Ligand **6** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

No.	Total Score	Match Score	Lipo-Score	Ambig-Score	Clash-Score	Rot-Score	RMS-Value	Simil. Index	#Match	Avg. Volume	Max. Volume	Frag. No.
1	-27.819	-45.010	-13.681	-15.016	5.489	35.000	0.000	-1.000	27	0.096	1.290	1
2	-27.819	-45.010	-13.681	-15.016	5.489	35.000	0.508	-1.000	27	0.096	1.290	1
3	-27.819	-45.010	-13.681	-15.016	5.489	35.000	0.981	-1.000	27	0.096	1.290	1
4	-27.819	-45.010	-13.681	-15.016	5.489	35.000	0.864	-1.000	27	0.096	1.290	1
5	-27.802	-44.869	-13.535	-14.676	4.878	35.000	1.495	-1.000	28	0.097	1.516	1
6	-27.797	-44.869	-13.546	-14.659	4.878	35.000	1.343	-1.000	28	0.097	1.516	1
7	-27.582	-44.869	-13.458	-14.533	4.878	35.000	1.209	-1.000	28	0.097	1.516	1
8	-27.480	-45.010	-13.681	-14.677	5.489	35.000	1.135	-1.000	27	0.096	1.290	1
9	-27.480	-45.010	-13.681	-14.677	5.489	35.000	0.901	-1.000	27	0.096	1.290	1
10	-27.480	-45.010	-13.681	-14.677	5.489	35.000	0.606	-1.000	27	0.096	1.290	1
11	-27.310	-45.010	-13.681	-14.507	5.489	35.000	1.433	-1.000	27	0.096	1.290	1
12	-27.310	-45.010	-13.681	-14.507	5.489	35.000	0.936	-1.000	27	0.096	1.290	1
13	-27.310	-45.010	-13.681	-14.507	5.489	35.000	0.903	-1.000	27	0.096	1.290	1
14	-27.310	-45.010	-13.681	-14.507	5.489	35.000	1.126	-1.000	27	0.096	1.290	1
15	-27.310	-45.010	-13.681	-14.507	5.489	35.000	1.123	-1.000	27	0.096	1.290	1
16	-27.093	-44.869	-13.188	-14.313	4.878	35.000	1.440	-1.000	28	0.097	1.516	1
17	-27.093	-44.869	-13.188	-14.313	4.878	35.000	1.096	-1.000	28	0.097	1.516	1
18	-26.959	-45.096	-13.365	-15.009	6.110	35.000	1.126	-1.000	27	0.121	2.020	1
19	-26.959	-45.096	-13.365	-15.009	6.110	35.000	0.859	-1.000	27	0.121	2.020	1
20	-26.959	-45.096	-13.365	-15.009	6.110	35.000	0.348	-1.000	27	0.121	2.020	1
21	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	9.790	-1.000	16	0.163	1.937	0
22	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	10.356	-1.000	16	0.163	1.937	0
23	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	9.841	-1.000	16	0.163	1.937	0

24	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	10.427	-1.000	16	0.163	1.937	0
25	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	9.845	-1.000	16	0.163	1.937	0
26	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	11.420	-1.000	16	0.163	1.937	0
27	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	10.423	-1.000	16	0.163	1.937	0
28	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	11.443	-1.000	16	0.163	1.937	0
29	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	11.379	-1.000	16	0.163	1.937	0
30	-8.681	-35.793	-11.131	-8.901	6.745	35.000	10.763	-1.000	16	0.163	1.937	0

6.2.2 Dockingergebnisse mit Glide (Schrödinger)

Tab. 21: Docking-Ergebnis für Ligand **51** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	Glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,0576	-9,0576	-9,0576	-17,1731	-34,8602	-52,0332	7,1999	-71,3840	-5,7227	-0,2922
2	-8,4047	-8,4047	-8,4047	-18,9557	-30,5043	-49,4600	9,5664	-63,5151	-4,0103	-0,2711
3	-8,1417	-8,1417	-8,1417	-19,5082	-29,6020	-49,1102	14,7036	-60,3791	-3,6937	-0,2626
4	-7,9208	-7,9208	-7,9208	-24,3340	-24,0388	-48,3728	0,0000	-63,3703	-3,3006	-0,2555
5	-7,8571	-7,8571	-7,8571	-21,1169	-26,6589	-47,7758	7,6205	-61,6999	-4,3183	-0,2535
6	-7,8143	-7,8143	-7,8143	-25,7656	-23,0035	-48,7692	7,4312	-56,5477	-4,5387	-0,2521
7	-7,6954	-7,6954	-7,6954	-19,4223	-27,9964	-47,4187	11,5854	-56,4995	-4,0786	-0,2482
8	-7,5913	-7,5913	-7,5913	-18,6455	-25,4857	-44,1313	11,9323	-52,6860	-4,3200	-0,2449
9	-7,5905	-7,5905	-7,5905	-18,9294	-28,7972	-47,7266	10,0233	-63,4623	-4,3043	-0,2449
10	-7,3218	-7,3218	-7,3218	-16,8060	-26,0543	-42,8603	5,5906	-61,3401	-3,8786	-0,2362
11	-7,1709	-7,1709	-7,1709	-15,4881	-31,1877	-46,6758	7,5492	-58,5216	-4,7521	-0,2313
12	-7,0480	-7,0480	-7,0480	-23,7804	-25,6140	-49,3945	13,2660	-57,3221	-3,2360	-0,2274
13	-6,9877	-6,9877	-6,9877	-14,4592	-28,9120	-43,3712	0,0000	-59,9357	-4,4062	-0,2254
14	-6,9853	-6,9853	-6,9853	-22,4421	-20,7939	-43,2360	6,9230	-52,3579	-3,7067	-0,2253
15	-6,8252	-6,8252	-6,8252	-20,8353	-24,3464	-45,1817	10,7308	-58,0596	-4,0235	-0,2202
16	-6,7669	-6,7669	-6,7669	-19,9700	-25,3494	-45,3194	12,5533	-61,2242	-3,3185	-0,2183
17	-6,6701	-6,6701	-6,6701	-22,7129	-23,5539	-46,2668	15,6985	-56,9390	-3,1710	-0,2152
18	-6,4990	-6,4990	-6,4990	-17,5212	-24,1869	-41,7081	4,3653	-65,9079	-4,1575	-0,2096
19	-6,4582	-6,4582	-6,4582	-25,3246	-18,9656	-44,2901	0,0000	-56,2456	-3,3762	-0,2083
20	-6,3919	-6,3919	-6,3919	-6,6260	-32,8749	-39,5009	8,2678	-55,1711	-4,1448	-0,2062
21	-6,2535	-6,2535	-6,2535	-27,4474	-17,1585	-44,6058	13,7707	-54,3565	-3,1460	-0,2017
22	-6,1336	-6,1336	-6,1336	-18,8039	-20,7292	-39,5331	6,9157	-44,6637	-1,9200	-0,1979
23	-6,0022	-6,0022	-6,0022	-26,5240	-13,2750	-39,7990	7,6928	-45,6935	-3,1425	-0,1936
24	-5,9471	-5,9471	-5,9471	-23,5018	-16,2829	-39,7847	0,0000	-55,4161	-3,3517	-0,1918
25	-5,9170	-5,9170	-5,9170	-6,2298	-32,0045	-38,2343	11,2372	-55,1057	-2,4215	-0,1909
26	-5,8205	-5,8205	-5,8205	-26,4652	-19,2412	-45,7064	2,3519	-60,8682	-2,8482	-0,1878
27	-5,7393	-5,7393	-5,7393	-19,0902	-18,8759	-37,9661	10,3125	-53,0256	-3,2431	-0,1851
28	-5,6386	-5,6386	-5,6386	-19,5818	-24,1477	-43,7295	7,5844	-55,1059	-3,0398	-0,1819

29	-5,4995	-5,4995	-5,4995	-26,5079	-16,7641	-43,2720	3,2772	-61,2683	-2,7370	-0,1774
30	-4,5694	-4,5694	-4,5694	-8,2742	-23,7521	-32,0262	0,0000	-50,2812	-3,1234	-0,1474
31	-3,4591	-3,4591	-3,4591	-25,5560	-7,1276	-32,6836	7,4152	-44,1731	-1,5472	-0,1116
32	-2,6410	-2,6410	-2,6410	-21,0823	-7,7248	-28,8071	8,3634	-40,9684	-1,0659	-0,0852

Tab. 22: Docking-Ergebnis für Ligand **51** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,5063	-9,5063	-9,5063	-29,3431	-27,0715	-56,4146	7,7634	-87,6237	-5,1294	-0,3067
2	-8,8396	-8,8396	-8,8396	-25,5760	-28,8496	-54,4256	7,3625	-81,0816	-5,0789	-0,2851
3	-8,5962	-8,5962	-8,5962	-31,2516	-28,2620	-59,5136	11,6018	-83,9360	-5,1158	-0,2773
4	-8,2516	-8,2516	-8,2516	-26,2629	-28,3034	-54,5663	13,3119	-75,3139	-4,3393	-0,2662
5	-8,2515	-8,2515	-8,2515	-25,1982	-26,9402	-52,1383	2,0968	-78,0318	-3,7425	-0,2662
6	-8,2034	-8,2034	-8,2034	-24,9278	-29,4546	-54,3824	0,0000	-85,1864	-4,3920	-0,2646
7	-8,0669	-8,0669	-8,0669	-17,0814	-27,5856	-44,6670	12,2353	-69,1068	-3,1573	-0,2602
8	-7,9736	-7,9736	-7,9736	-25,5704	-26,6106	-52,1810	7,1535	-73,0185	-4,7336	-0,2572
9	-7,9714	-7,9714	-7,9714	-25,3644	-26,5248	-51,8892	4,8564	-79,7995	-4,2217	-0,2571
10	-7,9047	-7,9047	-7,9047	-24,8354	-26,9455	-51,7809	4,5553	-77,4570	-4,2642	-0,2550
11	-7,7910	-7,7910	-7,7910	-28,7728	-23,4864	-52,2592	3,3629	-78,0666	-3,6061	-0,2513
12	-7,7426	-7,7426	-7,7426	-32,3717	-19,2319	-51,6036	4,2304	-71,8306	-4,2468	-0,2498
13	-7,7119	-7,7119	-7,7119	-29,5640	-20,7071	-50,2711	10,5014	-72,7789	-4,2353	-0,2488
14	-7,6544	-7,6544	-7,6544	-29,5572	-24,3529	-53,9101	4,4978	-76,2217	-3,7947	-0,2469
15	-7,5591	-7,5591	-7,5591	-22,7880	-28,1643	-50,9524	4,2712	-73,8461	-3,9031	-0,2438
16	-7,5084	-7,5084	-7,5084	-26,1835	-22,7784	-48,9619	4,7345	-74,2700	-3,1394	-0,2422
17	-7,5026	-7,5026	-7,5026	-19,5192	-23,2875	-42,8067	11,6085	-54,6351	-4,5169	-0,2420
18	-7,4594	-7,4594	-7,4594	-23,2728	-25,8239	-49,0967	11,3362	-70,4983	-3,7083	-0,2406
19	-7,3198	-7,3198	-7,3198	-27,2216	-17,9395	-45,1611	6,1142	-53,6480	-3,9173	-0,2361
20	-7,1758	-7,1758	-7,1758	-32,4737	-24,6126	-57,0863	7,0206	-83,7173	-3,2025	-0,2315
21	-7,1546	-7,1546	-7,1546	-25,0953	-20,4112	-45,5065	0,0000	-69,8446	-3,1680	-0,2308
22	-6,8947	-6,8947	-6,8947	-24,2571	-19,7468	-44,0039	5,6359	-60,7509	-2,4576	-0,2224
23	-6,8400	-6,8400	-6,8400	-23,5258	-22,8480	-46,3738	4,6781	-66,0888	-3,2806	-0,2206
24	-6,7198	-6,7198	-6,7198	-25,2975	-25,9455	-51,2430	9,1971	-76,3708	-3,6397	-0,2168
25	-6,5079	-6,5079	-6,5079	-22,7304	-18,3539	-41,0843	6,1519	-55,3062	-3,5843	-0,2099
26	-6,3786	-6,3786	-6,3786	-30,3296	-20,2565	-50,5861	4,4652	-68,4427	-3,4396	-0,2058
27	-6,3640	-6,3640	-6,3640	-25,7154	-19,1288	-44,8442	6,0558	-64,4784	-3,2312	-0,2053
28	-5,9738	-5,9738	-5,9738	-27,2841	-23,0273	-50,3114	14,2360	-60,8665	-3,0538	-0,1927
29	-5,9305	-5,9305	-5,9305	-24,0035	-24,3072	-48,3107	9,4792	-51,8109	-2,7659	-0,1913
30	-5,8285	-5,8285	-5,8285	-25,5949	-17,1245	-42,7195	5,0057	-56,4492	-2,6136	-0,1880
31	-5,4805	-5,4805	-5,4805	-24,1920	-18,3189	-42,5109	5,7261	-60,3946	-2,2298	-0,1768
32	-5,4723	-5,4723	-5,4723	-25,6562	-17,3580	-43,0142	5,6209	-46,1060	-2,4953	-0,1765

Tab. 23: Docking-Ergebnis für Ligand **50** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,1287	-9,1287	-9,1287	-16,7201	-36,8246	-53,5446	6,4236	-80,8026	-5,8629	-0,3381
2	-9,0788	-9,0788	-9,0788	-17,0104	-32,6712	-49,6816	7,8217	-80,5658	-5,6951	-0,3363
3	-8,0425	-8,0425	-8,0425	-14,6910	-28,9653	-43,6563	6,4185	-70,9085	-4,2278	-0,2979
4	-8,0372	-8,0372	-8,0372	-19,5673	-28,4357	-48,0030	7,6132	-73,9724	-4,0280	-0,2977
5	-7,9919	-7,9919	-7,9919	-23,3300	-27,4975	-50,8276	6,0611	-72,6804	-4,4840	-0,2960
6	-7,9877	-7,9877	-7,9877	-12,8182	-35,8199	-48,6381	10,3460	-75,2479	-4,2864	-0,2958
7	-7,9148	-7,9148	-7,9148	-22,7888	-26,1655	-48,9544	8,1025	-65,7291	-3,6945	-0,2931
8	-7,8972	-7,8972	-7,8972	-18,5154	-29,8597	-48,3751	3,7731	-69,5516	-4,7417	-0,2925
9	-7,7993	-7,7993	-7,7993	-19,8743	-29,0675	-48,9418	8,1247	-71,6130	-4,2065	-0,2889
10	-7,7822	-7,7822	-7,7822	-22,1685	-23,2211	-45,3896	6,4859	-69,6533	-3,6945	-0,2882
11	-7,7490	-7,7490	-7,7490	-8,9169	-38,6746	-47,5915	10,0806	-71,4675	-4,5346	-0,2870
12	-7,6906	-7,6906	-7,6906	-13,8516	-30,2316	-44,0832	10,9663	-65,3922	-4,1926	-0,2848
13	-7,6430	-7,6430	-7,6430	-20,5600	-28,2247	-48,7847	9,0835	-67,4713	-4,1096	-0,2831
14	-7,5968	-7,5968	-7,5968	-19,2699	-28,5156	-47,7855	5,9544	-71,5305	-4,2751	-0,2814
15	-7,5639	-7,5639	-7,5639	-11,3367	-33,5209	-44,8576	8,0134	-66,6259	-4,1361	-0,2801
16	-7,3913	-7,3913	-7,3913	-16,8317	-28,9277	-45,7594	11,3368	-67,0752	-4,1378	-0,2738
17	-7,3247	-7,3247	-7,3247	-15,3265	-31,8818	-47,2083	11,6810	-63,6791	-4,2348	-0,2713
18	-7,1050	-7,1050	-7,1050	-24,4757	-22,3090	-46,7847	10,1019	-69,7667	-3,2143	-0,2631
19	-7,0640	-7,0640	-7,0640	-18,8004	-27,0058	-45,8062	7,7647	-66,5063	-3,2123	-0,2616
20	-6,8911	-6,8911	-6,8911	-20,6020	-25,7675	-46,3695	10,6095	-66,0850	-3,3636	-0,2552
21	-6,8715	-6,8715	-6,8715	-21,3888	-20,3875	-41,7763	5,8543	-53,9928	-3,1645	-0,2545
22	-6,8118	-6,8118	-6,8118	-18,8585	-27,7348	-46,5932	15,4595	-64,4308	-3,2039	-0,2523
23	-6,7436	-6,7436	-6,7436	-25,7389	-22,1631	-47,9020	6,5988	-62,8853	-3,2171	-0,2498
24	-6,7385	-6,7385	-6,7385	-16,7592	-28,4792	-45,2384	5,8671	-68,8867	-3,0144	-0,2496
25	-6,7236	-6,7236	-6,7236	-23,5498	-25,4709	-49,0207	0,0000	-64,0302	-3,1442	-0,2490
26	-6,5753	-6,5753	-6,5753	-27,5340	-20,2284	-47,7624	0,0000	-63,7975	-3,2081	-0,2435
27	-6,4807	-6,4807	-6,4807	-22,9269	-21,1901	-44,1169	10,8620	-57,3059	-3,1335	-0,2400
28	-6,3476	-6,3476	-6,3476	-24,9408	-22,8374	-47,7782	0,0000	-68,7013	-3,1462	-0,2351
29	-6,1939	-6,1939	-6,1939	-27,9951	-18,8007	-46,7958	9,8442	-61,4352	-2,4000	-0,2294
30	-6,1369	-6,1369	-6,1369	-22,3657	-20,4075	-42,7732	8,8543	-55,3779	-2,9275	-0,2273
31	-6,0672	-6,0672	-6,0672	-24,3295	-23,2977	-47,6272	10,4674	-68,4112	-3,0288	-0,2247
32	-5,8635	-5,8635	-5,8635	-26,3126	-19,5803	-45,8930	11,2160	-60,2409	-2,4664	-0,2172

Tab. 24: Docking-Ergebnis für Ligand **50** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
--	---------------	-----------	--------------	------------	-------------	--------------	-----------------	--------------	----------	-------------------------

1	-9,0922	-9,0922	-9,0922	-20,5865	-35,7508	-56,3373	10,1210	-82,5195	-5,6438	-0,3367
2	-8,8220	-8,8220	-8,8220	-21,8314	-33,6973	-55,5287	3,8738	-88,0717	-5,3409	-0,3267
3	-8,3507	-8,3507	-8,3507	-24,1059	-28,2836	-52,3895	10,8553	-80,1754	-4,5099	-0,3093
4	-8,1025	-8,1025	-8,1025	-19,0546	-35,2154	-54,2700	2,0113	-83,5054	-4,6744	-0,3001
5	-8,0737	-8,0737	-8,0737	-27,0264	-24,9413	-51,9677	4,8485	-77,7414	-3,9211	-0,2990
6	-8,0538	-8,0538	-8,0538	-18,5359	-35,9628	-54,4987	4,6694	-87,3045	-4,8548	-0,2983
7	-7,9449	-7,9449	-7,9449	-20,6448	-32,3933	-53,0381	8,4928	-78,6075	-4,1617	-0,2943
8	-7,8890	-7,8890	-7,8890	-23,5679	-28,0367	-51,6045	4,2940	-77,5928	-4,3837	-0,2922
9	-7,7115	-7,7115	-7,7115	-23,3443	-22,2896	-45,6339	9,8510	-65,4641	-4,2496	-0,2856
10	-7,7033	-7,7033	-7,7033	-17,1710	-27,7755	-44,9465	5,5344	-60,8031	-2,4800	-0,2853
11	-7,6828	-7,6828	-7,6828	-21,0993	-28,8434	-49,9427	8,9585	-75,7037	-4,1323	-0,2845
12	-7,6643	-7,6643	-7,6643	-21,4286	-26,7068	-48,1355	4,0271	-70,9280	-4,2066	-0,2839
13	-7,6338	-7,6338	-7,6338	-18,5960	-29,3392	-47,9352	6,6751	-64,8433	-4,3181	-0,2827
14	-7,5637	-7,5637	-7,5637	-23,4371	-25,0380	-48,4751	0,0000	-71,3466	-3,8000	-0,2801
15	-7,5358	-7,5358	-7,5358	-21,9902	-28,0559	-50,0461	4,6800	-68,2072	-3,7657	-0,2791
16	-7,5181	-7,5181	-7,5181	-23,7894	-26,8584	-50,6479	6,6484	-70,8976	-3,9029	-0,2784
17	-7,4259	-7,4259	-7,4259	-24,2253	-24,0468	-48,2721	4,2561	-65,5624	-3,5196	-0,2750
18	-7,4182	-7,4182	-7,4182	-24,9265	-22,1186	-47,0451	7,5253	-64,0385	-4,4116	-0,2747
19	-7,4095	-7,4095	-7,4095	-19,8538	-30,3515	-50,2053	9,7659	-72,0602	-3,7280	-0,2744
20	-7,3796	-7,3796	-7,3796	-23,8180	-25,2407	-49,0588	6,8873	-73,8802	-3,5701	-0,2733
21	-7,2430	-7,2430	-7,2430	-25,5367	-23,6783	-49,2150	8,6537	-65,2728	-3,6516	-0,2683
22	-7,1399	-7,1399	-7,1399	-14,3963	-33,2549	-47,6512	7,8393	-60,5007	-2,8113	-0,2644
23	-7,0732	-7,0732	-7,0732	-24,6558	-24,4909	-49,1467	1,9750	-72,1150	-3,5142	-0,2620
24	-7,0546	-7,0546	-7,0546	-19,2684	-20,7345	-40,0030	9,1845	-58,2866	-1,9956	-0,2613
25	-6,8429	-6,8429	-6,8429	-21,4898	-25,6877	-47,1775	12,1886	-61,3377	-3,5807	-0,2534
26	-6,5438	-6,5438	-6,5438	-22,3000	-27,9189	-50,2189	4,8537	-71,9237	-2,8967	-0,2424
27	-6,5002	-6,5002	-6,5002	-25,7182	-21,8261	-47,5444	10,8358	-65,6046	-2,9363	-0,2407
28	-6,4219	-6,4219	-6,4219	-26,0317	-15,7013	-41,7331	0,0000	-61,5500	-2,7415	-0,2379
29	-6,3733	-6,3733	-6,3733	-24,3419	-18,5419	-42,8838	6,0516	-52,7071	-2,6942	-0,2360
30	-6,1513	-6,1513	-6,1513	-19,1730	-19,9813	-39,1543	12,3784	-61,1854	-3,6037	-0,2278
31	-6,1412	-6,1412	-6,1412	-24,9137	-22,7036	-47,6173	6,5592	-62,2882	-2,8540	-0,2275
32	-6,1191	-6,1191	-6,1191	-23,5972	-23,7841	-47,3813	0,0000	-59,5502	-2,9299	-0,2266

Tab. 25: Docking-Ergebnis für Ligand MeMan in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-8,4974	-8,4974	-8,4974	-15,0730	-29,8326	-44,9056	2,9046	-63,5763	-5,6135	-0,6536
2	-8,4266	-8,4266	-8,4266	-14,7866	-29,0821	-43,8687	1,9608	-63,0219	-5,1744	-0,6482
3	-7,9766	-7,9766	-7,9766	-13,0009	-27,9669	-40,9677	3,0923	-57,9981	-4,6235	-0,6136
4	-7,3500	-7,3500	-7,3500	-11,3611	-28,3328	-39,6939	2,2839	-54,4991	-4,4162	-0,5654
5	-7,3083	-7,3083	-7,3083	-9,2566	-33,4248	-42,6814	9,2399	-51,9001	-4,6528	-0,5622

6	-7,2028	-7,2028	-7,2028	-13,9342	-26,7694	-40,7036	1,9756	-58,5020	-4,3332	-0,5541
7	-7,1242	-7,1242	-7,1242	-14,8972	-21,8020	-36,6992	4,9939	-48,7862	-4,2105	-0,5480
8	-7,0847	-7,0847	-7,0847	-11,5218	-25,4244	-36,9462	0,4555	-49,7733	-3,7083	-0,5450
9	-7,0225	-7,0225	-7,0225	-8,7860	-30,3111	-39,0971	2,5843	-53,1657	-4,0624	-0,5402
10	-6,9636	-6,9636	-6,9636	-15,1237	-21,6521	-36,7758	2,1430	-49,6811	-4,1161	-0,5357
11	-6,9282	-6,9282	-6,9282	-9,9002	-28,0993	-37,9994	5,3704	-52,6237	-4,2443	-0,5329
12	-6,8756	-6,8756	-6,8756	-9,6667	-27,6037	-37,2704	5,2892	-51,6845	-4,2318	-0,5289
13	-6,7663	-6,7663	-6,7663	-16,7014	-18,7458	-35,4472	3,5245	-47,6705	-4,2469	-0,5205
14	-6,7581	-6,7581	-6,7581	-11,5202	-25,2668	-36,7870	3,7981	-48,5150	-4,1041	-0,5199
15	-6,7191	-6,7191	-6,7191	-10,8195	-26,4243	-37,2438	2,7786	-45,1287	-3,5943	-0,5169
16	-6,7005	-6,7005	-6,7005	-7,8488	-29,4036	-37,2523	1,5632	-38,4805	-2,9775	-0,5154
17	-6,5951	-6,5951	-6,5951	-14,0869	-27,1651	-41,2520	8,7762	-49,8094	-3,5909	-0,5073
18	-6,5950	-6,5950	-6,5950	-10,6787	-25,8220	-36,5007	0,7358	-47,3289	-3,6688	-0,5073
19	-6,5154	-6,5154	-6,5154	-13,9277	-24,8222	-38,7498	5,5359	-50,0894	-3,7063	-0,5012
20	-6,3903	-6,3903	-6,3903	-12,8559	-22,2106	-35,0665	0,0000	-46,0244	-2,8970	-0,4916
21	-6,3775	-6,3775	-6,3775	-10,5409	-27,1055	-37,6463	0,0000	-52,9581	-3,5992	-0,4906
22	-6,2845	-6,2845	-6,2845	-16,2413	-25,6818	-41,9231	6,8142	-54,6612	-3,3166	-0,4834
23	-6,2816	-6,2816	-6,2816	-9,2986	-22,3352	-31,6338	0,0000	-37,8721	-3,1585	-0,4832
24	-6,2806	-6,2806	-6,2806	-11,6305	-23,6591	-35,2897	4,8275	-48,0476	-3,7083	-0,4831
25	-6,2617	-6,2617	-6,2617	-11,5248	-24,5994	-36,1243	1,6991	-45,1099	-3,2715	-0,4817
26	-6,1337	-6,1337	-6,1337	-15,8405	-20,0491	-35,8896	1,5413	-46,9415	-2,9674	-0,4718
27	-6,0496	-6,0496	-6,0496	-14,2512	-21,7951	-36,0464	0,5668	-50,1252	-3,2498	-0,4654
28	-5,9889	-5,9889	-5,9889	-11,7354	-23,0027	-34,7381	8,9150	-40,7145	-2,8401	-0,4607
29	-5,9443	-5,9443	-5,9443	-17,8516	-21,6697	-39,5214	8,4349	-50,7083	-3,1906	-0,4573
30	-5,9183	-5,9183	-5,9183	-8,4324	-24,4466	-32,8790	2,2589	-44,5363	-3,3292	-0,4553
31	-5,8165	-5,8165	-5,8165	-16,9325	-20,5382	-37,4707	6,2476	-44,6971	-3,1806	-0,4474
32	-5,7331	-5,7331	-5,7331	-17,7237	-22,0445	-39,7682	4,5766	-48,7963	-2,9509	-0,4410

Tab. 26: Docking-Ergebnis für Ligand MeMan in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-8,3199	-8,3199	-8,3199	-2,7776	-37,0849	-39,8624	8,1810	-49,6722	-5,6511	-0,6400
2	-7,9719	-7,9719	-7,9719	-2,4169	-36,7431	-39,1600	3,5736	-56,3282	-5,3462	-0,6132
3	-7,6057	-7,6057	-7,6057	-9,9160	-27,2457	-37,1617	3,3898	-53,0030	-4,1098	-0,5851
4	-7,2709	-7,2709	-7,2709	-15,0879	-21,7919	-36,8798	6,8174	-43,3635	-3,9867	-0,5593
5	-7,2343	-7,2343	-7,2343	-9,3829	-26,4611	-35,8441	6,5033	-43,2862	-4,1766	-0,5565
6	-7,2078	-7,2078	-7,2078	-9,5751	-25,8838	-35,4589	1,7178	-47,9252	-3,6896	-0,5544
7	-7,1884	-7,1884	-7,1884	-6,5341	-27,6378	-34,1718	4,9790	-47,1489	-3,1746	-0,5530
8	-7,1433	-7,1433	-7,1433	3,2670	-39,3164	-36,0494	7,9546	-44,5731	-4,7004	-0,5495
9	-7,1047	-7,1047	-7,1047	-4,3545	-29,1694	-33,5238	3,5790	-46,4705	-2,5547	-0,5465
10	-7,0832	-7,0832	-7,0832	-9,0329	-28,0673	-37,1003	7,1390	-46,9954	-4,2887	-0,5449

11	-7,0717	-7,0717	-7,0717	3,4378	-38,6939	-35,2560	5,4288	-47,1256	-4,2784	-0,5440
12	-6,9342	-6,9342	-6,9342	-5,8043	-25,1334	-30,9377	8,8247	-41,9790	-3,9326	-0,5334
13	-6,7689	-6,7689	-6,7689	-11,4614	-24,4911	-35,9525	2,0034	-47,4035	-2,1385	-0,5207
14	-6,7635	-6,7635	-6,7635	-7,5245	-26,3160	-33,8404	2,5616	-47,8461	-2,9907	-0,5203
15	-6,6901	-6,6901	-6,6901	-3,0675	-33,6659	-36,7334	12,5020	-46,0476	-3,9957	-0,5146
16	-6,6644	-6,6644	-6,6644	-7,1870	-30,0008	-37,1877	5,1115	-49,2171	-3,8563	-0,5126
17	-6,6277	-6,6277	-6,6277	-6,7358	-27,3792	-34,1150	3,8581	-45,4621	-3,6643	-0,5098
18	-6,6212	-6,6212	-6,6212	-7,1673	-30,0128	-37,1800	0,0000	-50,1688	-3,5935	-0,5093
19	-6,5548	-6,5548	-6,5548	-13,2965	-16,4823	-29,7788	0,0000	-40,4456	-3,3112	-0,5042
20	-6,3471	-6,3471	-6,3471	1,9639	-34,6154	-32,6515	9,1049	-41,7145	-3,9563	-0,4882
21	-6,3099	-6,3099	-6,3099	-12,4752	-22,2737	-34,7489	3,9871	-42,5585	-3,0094	-0,4854
22	-6,1951	-6,1951	-6,1951	-13,5475	-24,7524	-38,2998	9,6191	-48,0600	-3,2057	-0,4765
23	-6,1468	-6,1468	-6,1468	-7,1994	-26,2098	-33,4092	10,0479	-42,5860	-3,2024	-0,4728
24	-6,1102	-6,1102	-6,1102	-7,7931	-24,8589	-32,6519	1,7598	-45,7430	-3,1817	-0,4700
25	-6,1073	-6,1073	-6,1073	-11,8606	-22,7729	-34,6335	0,0000	-45,0288	-3,2116	-0,4698
26	-6,1071	-6,1071	-6,1071	-10,3740	-24,4911	-34,8651	3,5761	-34,3180	-3,1462	-0,4698
27	-6,0988	-6,0988	-6,0988	-6,2370	-27,1245	-33,3615	4,8440	-44,1231	-3,1109	-0,4691
28	-5,8669	-5,8669	-5,8669	-15,7870	-18,8666	-34,6535	5,6796	-44,0933	-3,1462	-0,4513
29	-5,7730	-5,7730	-5,7730	-12,0456	-21,2908	-33,3364	6,8203	-34,3478	-3,6404	-0,4441
30	-5,7675	-5,7675	-5,7675	-4,2942	-30,0372	-34,3314	8,3578	-44,4609	-3,0155	-0,4437
31	-5,6112	-5,6112	-5,6112	-13,6534	-25,5386	-39,1920	10,9198	-46,5345	-2,5117	-0,4316
32	-5,5005	-5,5005	-5,5005	-16,1092	-16,5233	-32,6324	5,8646	-38,6170	-2,4278	-0,4231

Tab. 27: Docking-Ergebnis für Ligand *p*NPMan in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,2279	-9,2279	-9,2279	-23,2379	-27,0117	-50,2496	4,9446	-74,1834	-4,2518	-0,4394
2	-8,7545	-8,7545	-8,7545	-16,8483	-29,0539	-45,9022	0,0000	-72,5582	-4,8581	-0,4169
3	-8,6962	-8,6962	-8,6962	-19,2569	-28,5357	-47,7925	3,6422	-70,8523	-5,5370	-0,4141
4	-8,2449	-8,2449	-8,2449	-23,2419	-25,5152	-48,7571	11,7107	-62,2863	-4,5513	-0,3926
5	-8,0389	-8,0389	-8,0389	-18,0430	-28,7012	-46,7442	3,9704	-67,5201	-4,3423	-0,3828
6	-7,9617	-7,9617	-7,9617	-21,9530	-21,4125	-43,3655	5,1598	-59,5556	-4,1970	-0,3791
7	-7,8319	-7,8319	-7,8319	-17,2672	-28,8240	-46,0913	10,1654	-62,0206	-4,3491	-0,3729
8	-7,8125	-7,8125	-7,8125	-17,2881	-26,0530	-43,3411	6,0543	-54,3871	-4,2233	-0,3720
9	-7,7317	-7,7317	-7,7317	-12,1598	-25,8782	-38,0380	1,6906	-37,7892	-2,6608	-0,3682
10	-7,6980	-7,6980	-7,6980	-22,3714	-23,6857	-46,0572	3,7324	-63,2649	-4,2643	-0,3666
11	-7,4676	-7,4676	-7,4676	-19,8080	-23,4627	-43,2707	0,0000	-61,4660	-3,1743	-0,3556
12	-7,4448	-7,4448	-7,4448	-24,6716	-18,2287	-42,9004	10,4600	-56,2879	-2,8662	-0,3545
13	-7,3863	-7,3863	-7,3863	-16,2762	-27,1765	-43,4527	4,6386	-58,9341	-3,0798	-0,3517
14	-7,3246	-7,3246	-7,3246	-17,8967	-25,7153	-43,6120	3,8242	-54,5689	-3,6379	-0,3488
15	-7,2776	-7,2776	-7,2776	-16,6342	-25,5111	-42,1453	1,7660	-58,2433	-3,7083	-0,3466

16	-7,2429	-7,2429	-7,2429	-17,9270	-25,7577	-43,6847	8,9822	-59,7718	-3,7082	-0,3449
17	-7,1639	-7,1639	-7,1639	-14,9658	-28,0606	-43,0264	3,9827	-59,5545	-3,7083	-0,3411
18	-7,1585	-7,1585	-7,1585	-16,5659	-25,4223	-41,9882	4,4690	-50,2430	-3,7083	-0,3409
19	-7,1571	-7,1571	-7,1571	-6,1735	-27,6233	-33,7968	6,7540	-45,0861	-3,3203	-0,3408
20	-7,1024	-7,1024	-7,1024	-20,1371	-16,5274	-36,6645	1,7611	-52,4643	-4,0286	-0,3382
21	-7,0714	-7,0714	-7,0714	-24,8927	-24,1693	-49,0620	0,0000	-67,2416	-3,2147	-0,3367
22	-7,0041	-7,0041	-7,0041	-19,7274	-22,6984	-42,4257	2,1850	-59,6420	-3,7033	-0,3335
23	-6,9990	-6,9990	-6,9990	-16,5919	-17,8811	-34,4731	2,0083	-46,7075	-4,1360	-0,3333
24	-6,9754	-6,9754	-6,9754	-25,5352	-21,0925	-46,6277	0,0000	-65,1781	-3,2601	-0,3322
25	-6,9399	-6,9399	-6,9399	-23,7302	-21,7099	-45,4401	3,1281	-63,0942	-3,3240	-0,3305
26	-6,8047	-6,8047	-6,8047	-16,9526	-23,0008	-39,9534	3,5746	-54,0081	-3,3151	-0,3240
27	-6,7299	-6,7299	-6,7299	-20,4060	-21,6469	-42,0528	1,7333	-60,7693	-3,2507	-0,3205
28	-6,5904	-6,5904	-6,5904	-22,3196	-24,4463	-46,7659	3,2677	-55,6920	-3,1317	-0,3138
29	-6,3851	-6,3851	-6,3851	-15,8297	-24,8990	-40,7287	0,0000	-56,1285	-3,6204	-0,3041
30	-6,2814	-6,2814	-6,2814	-14,1764	-25,5306	-39,7070	13,2445	-44,5160	-2,7586	-0,2991
31	-6,1822	-6,1822	-6,1822	-23,7267	-20,3539	-44,0806	0,0000	-53,2640	-2,9454	-0,2944
32	-5,9015	-5,9015	-5,9015	-24,0119	-17,5868	-41,5987	9,8115	-49,6988	-2,6428	-0,2810

Tab. 28: Docking-Ergebnis für Ligand pNPMan in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking	XP	glide	glide	glide	glide	glide	glide	XP	glide
	score	GScore	gscore	evdw	ecoul	energy	einternal	emodel	HBond	ligand
										efficiency
1	-8,9947	-8,9947	-8,9947	-8,1428	-34,4681	-42,6109	9,9973	-56,2676	-5,7167	-0,4283
2	-8,2191	-8,2191	-8,2191	-10,8864	-29,9926	-40,8789	6,8079	-56,2605	-3,7534	-0,3914
3	-8,1312	-8,1312	-8,1312	-5,7809	-35,3827	-41,1636	5,5134	-55,6027	-5,7200	-0,3872
4	-8,0443	-8,0443	-8,0443	-16,0213	-25,5222	-41,5435	11,9596	-47,4647	-4,5718	-0,3831
5	-7,8490	-7,8490	-7,8490	-13,2286	-26,1590	-39,3876	6,7420	-56,2842	-4,2720	-0,3738
6	-7,8484	-7,8484	-7,8484	-6,0700	-33,0713	-39,1413	9,3425	-47,8957	-4,7123	-0,3737
7	-7,7637	-7,7637	-7,7637	-13,1516	-24,9831	-38,1347	7,8307	-49,5302	-3,7095	-0,3697
8	-7,6950	-7,6950	-7,6950	-9,3485	-26,0397	-35,3882	11,4586	-50,3261	-4,1080	-0,3664
9	-7,4438	-7,4438	-7,4438	-6,2396	-32,0528	-38,2924	12,6658	-51,6219	-4,2027	-0,3545
10	-7,3422	-7,3422	-7,3422	-12,0282	-25,8547	-37,8828	0,0000	-51,3038	-4,1996	-0,3496
11	-7,3331	-7,3331	-7,3331	-16,0236	-23,0152	-39,0388	5,5310	-52,8664	-3,7118	-0,3492
12	-7,3292	-7,3292	-7,3292	-13,3258	-26,7256	-40,0514	0,0000	-55,5163	-3,7061	-0,3490
13	-7,3013	-7,3013	-7,3013	-13,0122	-24,5696	-37,5818	4,3187	-45,9874	-3,6781	-0,3477
14	-7,1721	-7,1721	-7,1721	-4,4204	-30,6671	-35,0876	8,0602	-47,4502	-4,2914	-0,3415
15	-7,0336	-7,0336	-7,0336	-16,9344	-21,4783	-38,4127	6,9847	-49,4572	-3,2324	-0,3349
16	-6,8317	-6,8317	-6,8317	0,1320	-37,0356	-36,9036	3,9886	-50,2948	-3,9601	-0,3253
17	-6,8215	-6,8215	-6,8215	-13,8171	-25,2061	-39,0232	8,9383	-52,2292	-3,9315	-0,3248
18	-6,8071	-6,8071	-6,8071	-17,9450	-21,2466	-39,1916	10,2432	-47,5910	-3,2335	-0,3241
19	-6,7751	-6,7751	-6,7751	-6,5320	-29,8562	-36,3882	10,3253	-49,6600	-2,6662	-0,3226

20	-6,7103	-6,7103	-6,7103	-17,3746	-22,0194	-39,3939	10,5055	-47,2895	-3,1462	-0,3195
21	-6,6666	-6,6666	-6,6666	-12,4956	-24,7474	-37,2430	0,0000	-54,7981	-2,9580	-0,3175
22	-6,5884	-6,5884	-6,5884	-6,1733	-26,4305	-32,6038	0,0000	-53,9568	-3,2339	-0,3137
23	-6,4816	-6,4816	-6,4816	-12,6755	-25,2395	-37,9150	10,1267	-48,2792	-3,1998	-0,3086
24	-6,4757	-6,4757	-6,4757	-3,3594	-32,1013	-35,4607	7,3788	-47,8645	-4,0462	-0,3084
25	-6,4476	-6,4476	-6,4476	-13,9946	-23,4277	-37,4224	0,0000	-47,6752	-3,1461	-0,3070
26	-6,4219	-6,4219	-6,4219	-15,2515	-21,4093	-36,6608	4,5513	-43,3137	-0,9440	-0,3058
27	-6,3363	-6,3363	-6,3363	-3,6878	-32,9827	-36,6704	6,1865	-43,2049	-3,9775	-0,3017
28	-6,1978	-6,1978	-6,1978	-14,0953	-23,7587	-37,8540	2,1032	-51,9434	-3,2364	-0,2951
29	-6,1618	-6,1618	-6,1618	-19,3375	-15,8994	-35,2369	0,0000	-49,2767	-3,1458	-0,2934
30	-6,0166	-6,0166	-6,0166	-18,2058	-17,2752	-35,4809	11,1922	-40,5197	0,0000	-0,2865
31	-5,9350	-5,9350	-5,9350	-15,8739	-20,0505	-35,9244	3,4596	-50,4976	-3,2332	-0,2826
32	-5,8298	-5,8298	-5,8298	-15,6991	-24,0733	-39,7725	9,1256	-51,6693	-2,9413	-0,2776

Tab. 29: Docking-Ergebnis für Ligand **25** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	Glide ligand efficiency
1	-9,1522	-9,1522	-9,1522	-15,4309	-35,9043	-51,3352	12,5473	-57,8621	-5,6525	-0,2773
2	-7,9778	-7,9778	-7,9778	-5,5236	-35,6291	-41,1527	4,7153	-53,8382	-5,6761	-0,2418
3	-7,9249	-7,9249	-7,9249	-14,7680	-28,5875	-43,3555	9,1372	-52,4193	-2,8800	-0,2401
4	-7,5440	-7,5440	-7,5440	-8,8083	-31,9600	-40,7683	11,5067	-52,9082	-4,4297	-0,2286
5	-7,1966	-7,1966	-7,1966	-14,7450	-24,0816	-38,8266	0,0000	-43,0554	-4,3979	-0,2181
6	-7,1802	-7,1802	-7,1802	-12,8738	-28,0413	-40,9151	10,2111	-50,0298	-4,2048	-0,2176
7	-7,0790	-7,0790	-7,0790	-13,6599	-25,9791	-39,6389	7,1457	-55,1019	-4,2544	-0,2145
8	-6,9196	-6,9196	-6,9196	-5,1726	-33,5897	-38,7623	10,3253	-47,1934	-0,9600	-0,2097
9	-6,7624	-6,7624	-6,7624	-14,3828	-26,4927	-40,8755	3,4814	-57,2650	-3,7059	-0,2049
10	-6,7462	-6,7462	-6,7462	-0,6425	-37,3611	-38,0036	16,6072	-47,6535	-4,7560	-0,2044
11	-6,5771	-6,5771	-6,5771	-9,7933	-27,0364	-36,8297	9,3301	-51,9092	-3,9879	-0,1993
12	-6,5428	-6,5428	-6,5428	-7,6499	-28,5817	-36,2316	0,0000	-53,4547	-4,1923	-0,1983
13	-6,4850	-6,4850	-6,4850	-9,9664	-30,1218	-40,0882	12,0894	-47,6857	-4,1994	-0,1965
14	-6,3785	-6,3785	-6,3785	-14,4578	-21,0595	-35,5173	9,2936	-51,7333	-3,2259	-0,1933
15	-6,3422	-6,3422	-6,3422	-16,9012	-17,5714	-34,4727	3,7105	-44,9891	-4,2046	-0,1922
16	-6,3237	-6,3237	-6,3237	-8,5234	-27,6579	-36,1813	9,5440	-48,9326	-3,9050	-0,1916
17	-6,2567	-6,2567	-6,2567	-0,0921	-37,0761	-37,1682	9,6153	-49,7425	-4,6605	-0,1896
18	-6,2344	-6,2344	-6,2344	-4,4041	-32,4587	-36,8627	8,4937	-50,3202	-0,8420	-0,1889
19	-6,2288	-6,2288	-6,2288	-11,4797	-22,5300	-34,0097	9,6407	-46,6262	-3,7117	-0,1888
20	-6,2184	-6,2184	-6,2184	-20,9150	-23,4920	-44,4070	0,0000	-53,4763	-3,2391	-0,1884
21	-5,6042	-5,6042	-5,6042	-14,0906	-23,6775	-37,7681	11,4249	-47,4358	-3,2365	-0,1698
22	-5,4887	-5,4887	-5,4887	-18,2825	-19,6952	-37,9777	9,2617	-48,6658	-3,0410	-0,1663
23	-5,3564	-5,3564	-5,3564	-7,9078	-27,0519	-34,9597	3,9243	-41,2164	-1,7204	-0,1623
24	-5,1748	-5,1748	-5,1748	-16,0493	-24,4089	-40,4583	9,4470	-51,4594	-0,7306	-0,1568
25	-4,3033	-4,3033	-4,3033	-25,1110	-10,1986	-35,3097	4,0087	-46,9301	-2,1695	-0,1304

26	-4,2144	-4,2144	-4,2144	-19,8901	-15,6605	-35,5506	5,2923	-46,6805	-1,5993	-0,1277
27	-4,0606	-4,0606	-4,0606	-21,2876	-18,7043	-39,9920	3,6658	-42,8923	-2,8687	-0,1230
28	-3,7584	-3,7584	-3,7584	-21,8719	-13,1698	-35,0417	3,4534	-42,6531	-1,4281	-0,1139
29	-3,4578	-3,4578	-3,4578	-23,0718	-11,4790	-34,5507	5,2406	-41,4377	-0,6727	-0,1048
30	-2,7166	-2,7166	-2,7166	-24,9671	-6,2260	-31,1931	0,0000	-42,0452	-1,4400	-0,0823
31	-2,6955	-2,6955	-2,6955	-20,6247	-8,1629	-28,7876	1,8393	-37,5938	-1,1450	-0,0817
32	-2,4473	-2,4473	-2,4473	-21,7476	-8,8664	-30,6140	8,2866	-41,1601	-1,2305	-0,0742

Tab. 30: Docking-Ergebnis für Ligand **25** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,3243	-9,3243	-9,3243	-24,5644	-32,5817	-57,1461	2,4009	-92,2254	-5,8332	-0,2826
2	-9,2939	-9,2939	-9,2939	-30,1808	-28,4192	-58,6001	4,7316	-84,0382	-5,2972	-0,2816
3	-9,2584	-9,2584	-9,2584	-23,4342	-31,0054	-54,4396	10,1909	-79,4029	-5,6860	-0,2806
4	-9,0510	-9,0510	-9,0510	-25,7389	-34,1435	-59,8824	9,9777	-75,8859	-5,1914	-0,2743
5	-8,9533	-8,9533	-8,9533	-28,3288	-28,9406	-57,2695	7,8761	-80,2900	-5,0650	-0,2713
6	-8,6964	-8,6964	-8,6964	-23,3908	-32,5541	-55,9448	17,7358	-76,2098	-4,3438	-0,2635
7	-8,6177	-8,6177	-8,6177	-25,7938	-29,4168	-55,2106	18,8595	-73,2723	-4,3491	-0,2611
8	-8,4464	-8,4464	-8,4464	-28,6610	-26,7485	-55,4095	11,1593	-73,1317	-3,7675	-0,2560
9	-8,4171	-8,4171	-8,4171	-24,5002	-27,8209	-52,3211	10,9950	-71,0531	-4,0193	-0,2551
10	-8,3440	-8,3440	-8,3440	-22,6510	-28,6496	-51,3006	5,0090	-76,2952	-4,1108	-0,2528
11	-8,2600	-8,2600	-8,2600	-24,2900	-27,3950	-51,6850	11,2570	-66,1931	-3,8559	-0,2503
12	-8,2098	-8,2098	-8,2098	-24,9396	-28,6948	-53,6343	7,1983	-65,9119	-3,7085	-0,2488
13	-7,9317	-7,9317	-7,9317	-31,8462	-26,7545	-58,6007	14,0815	-83,0690	-3,9245	-0,2404
14	-7,7609	-7,7609	-7,7609	-25,1092	-25,7428	-50,8520	9,1178	-67,9940	-4,4169	-0,2352
15	-7,7326	-7,7326	-7,7326	-22,0764	-28,2963	-50,3726	10,0355	-63,8003	-4,4083	-0,2343
16	-7,5650	-7,5650	-7,5650	-25,9737	-24,1396	-50,1133	10,5298	-69,4797	-4,2468	-0,2292
17	-7,5528	-7,5528	-7,5528	-24,0751	-26,6072	-50,6823	5,6045	-60,0751	-3,9146	-0,2289
18	-7,4397	-7,4397	-7,4397	-26,5882	-24,5246	-51,1129	3,7664	-72,9324	-3,2533	-0,2254
19	-7,3742	-7,3742	-7,3742	-29,7575	-26,2700	-56,0276	10,5434	-62,5565	-3,2295	-0,2235
20	-7,3107	-7,3107	-7,3107	-21,2432	-28,5579	-49,8011	8,6753	-62,6595	-2,9839	-0,2215
21	-7,2795	-7,2795	-7,2795	-28,3177	-22,0524	-50,3701	5,3989	-69,4681	-3,2099	-0,2206
22	-7,2784	-7,2784	-7,2784	-25,6731	-21,9033	-47,5764	13,5241	-56,1724	-3,9252	-0,2206
23	-7,1205	-7,1205	-7,1205	-29,7444	-24,5629	-54,3073	6,8801	-67,7012	-2,9540	-0,2158
24	-7,0551	-7,0551	-7,0551	-22,7661	-23,7452	-46,5113	7,5431	-59,8956	-3,5406	-0,2138
25	-6,9175	-6,9175	-6,9175	-20,6754	-23,5259	-44,2013	8,9635	-60,9350	-3,1720	-0,2096
26	-6,7088	-6,7088	-6,7088	-23,0458	-25,6948	-48,7406	5,4625	-60,4225	-2,8238	-0,2033
27	-6,5490	-6,5490	-6,5490	-23,3606	-16,4289	-39,7894	3,6089	-48,5962	-4,6419	-0,1985
28	-6,5244	-6,5244	-6,5244	-23,8850	-15,8336	-39,7185	0,0000	-47,1915	-3,3785	-0,1977
29	-6,4337	-6,4337	-6,4337	-18,7091	-20,8192	-39,5283	5,8124	-52,8050	-2,6093	-0,1950
30	-6,2775	-6,2775	-6,2775	-25,9498	-19,4069	-45,3568	11,9502	-52,7996	-2,3126	-0,1902
31	-6,1909	-6,1909	-6,1909	-25,0608	-18,9066	-43,9674	0,0000	-53,9430	-2,6411	-0,1876

32 | -5,1119 | -5,1119 | -5,1119 | -21,7434 | -16,9687 | -38,7121 | 10,0091 | -46,1752 | -3,1237 | -0,1549

Tab. 31: Docking-Ergebnis für Ligand **26** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,7853	-9,7853	-9,7853	-21,8965	-39,9763	-61,8728	7,4435	-92,0291	-5,8995	-0,2509
2	-9,3753	-9,3753	-9,3753	-23,7412	-37,6213	-61,3625	7,3008	-98,4985	-5,8896	-0,2404
3	-8,5268	-8,5268	-8,5268	-26,7092	-34,3468	-61,0560	13,3820	-86,2148	-5,2803	-0,2186
4	-8,3955	-8,3955	-8,3955	-27,3674	-34,7744	-62,1419	10,7055	-82,7143	-5,3824	-0,2153
5	-8,2934	-8,2934	-8,2934	-28,3560	-26,8065	-55,1625	0,0000	-85,9080	-4,0956	-0,2127
6	-8,0529	-8,0529	-8,0529	-28,2535	-32,1466	-60,4001	7,9629	-82,8334	-5,5777	-0,2065
7	-8,0044	-8,0044	-8,0044	-25,4088	-34,5330	-59,9418	9,8170	-85,1102	-5,3012	-0,2052
8	-7,9927	-7,9927	-7,9927	-20,7626	-35,4073	-56,1700	8,2871	-91,5457	-4,8692	-0,2049
9	-7,9160	-7,9160	-7,9160	-22,8264	-34,2859	-57,1123	9,3132	-77,0479	-4,1695	-0,2030
10	-7,8900	-7,8900	-7,8900	-24,4713	-31,5173	-55,9886	8,4214	-76,9968	-4,8861	-0,2023
11	-7,6973	-7,6973	-7,6973	-26,9352	-26,5610	-53,4962	13,4895	-86,0471	-3,7214	-0,1974
12	-7,4160	-7,4160	-7,4160	-16,1813	-37,4505	-53,6318	19,9509	-77,0918	-4,7041	-0,1902
13	-7,3358	-7,3358	-7,3358	-23,6840	-26,5682	-50,2522	2,4227	-82,2263	-4,5314	-0,1881
14	-7,3342	-7,3342	-7,3342	-26,4794	-27,0698	-53,5492	8,0132	-81,3386	-3,8403	-0,1881
15	-7,2200	-7,2200	-7,2200	-19,2560	-37,3088	-56,5649	8,2712	-82,1511	-5,2759	-0,1851
16	-7,1510	-7,1510	-7,1510	-23,9803	-28,9965	-52,9768	12,2376	-79,7663	-4,7667	-0,1834
17	-6,9961	-6,9961	-6,9961	-33,4009	-16,4495	-49,8504	8,6083	-62,2615	-3,5556	-0,1794
18	-6,9801	-6,9801	-6,9801	-28,4028	-24,2722	-52,6751	11,7859	-74,4800	-2,5919	-0,1790
19	-6,8740	-6,8740	-6,8740	-25,0878	-30,3823	-55,4701	5,9759	-85,2088	-4,5329	-0,1763
20	-6,6734	-6,6734	-6,6734	-31,6706	-27,0246	-58,6952	2,9262	-87,9756	-3,2347	-0,1711
21	-6,5845	-6,5845	-6,5845	-29,6424	-22,6200	-52,2624	4,8266	-67,7395	-3,3600	-0,1688
22	-6,4886	-6,4886	-6,4886	-26,0459	-26,3803	-52,4262	6,5554	-78,5429	-3,6882	-0,1664
23	-6,2022	-6,2022	-6,2022	-30,2464	-25,8351	-56,0814	7,6745	-76,5736	-3,5876	-0,1590
24	-6,0527	-6,0527	-6,0527	-26,8650	-23,8896	-50,7547	16,9544	-67,5237	-2,2737	-0,1552
25	-6,0078	-6,0078	-6,0078	-26,6173	-24,3063	-50,9236	11,5813	-71,5834	-3,4651	-0,1540
26	-5,8456	-5,8456	-5,8456	-32,7043	-24,9740	-57,6783	6,5314	-77,5754	-3,4054	-0,1499
27	-5,7446	-5,7446	-5,7446	-23,5976	-26,5266	-50,1242	12,2081	-66,0308	-2,4047	-0,1473
28	-5,5543	-5,5543	-5,5543	-30,8388	-20,8732	-51,7121	9,3087	-66,9316	-3,1145	-0,1424
29	-5,2340	-5,2340	-5,2340	-30,9835	-21,1199	-52,1034	3,6902	-72,9083	-3,3039	-0,1342
30	-5,1177	-5,1177	-5,1177	-19,4998	-19,0105	-38,5102	4,5496	-58,3649	-2,3510	-0,1312
31	-4,9182	-4,9182	-4,9182	-28,0525	-18,5184	-46,5709	5,5833	-67,2833	-2,1819	-0,1261
32	-4,5501	-4,5501	-4,5501	-24,7189	-22,9237	-47,6426	9,5206	-59,8066	-2,7315	-0,1167

Tab. 32: Docking-Ergebnis für Ligand 26 in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	Glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-8,9782	-8,9782	-8,9782	-30,0908	-33,1608	-63,2516	5,1162	-105,6986	-5,7221	-0,2302
2	-8,6503	-8,6503	-8,6503	-28,0155	-33,3541	-61,3696	11,7744	-105,9481	-6,1637	-0,2218
3	-8,3731	-8,3731	-8,3731	-29,7727	-31,5964	-61,3690	6,6307	-97,8919	-5,1713	-0,2147
4	-8,1909	-8,1909	-8,1909	-27,0323	-27,8665	-54,8988	9,1826	-93,1936	-4,1795	-0,2100
5	-7,9798	-7,9798	-7,9798	-19,7770	-34,5086	-54,2856	11,3244	-79,2189	-5,2804	-0,2046
6	-7,7734	-7,7734	-7,7734	-33,3676	-32,8465	-66,2141	5,3229	-99,7853	-4,8595	-0,1993
7	-7,7309	-7,7309	-7,7309	-26,3343	-30,5166	-56,8509	7,7386	-96,6225	-4,2681	-0,1982
8	-7,6057	-7,6057	-7,6057	-29,8673	-36,1896	-66,0569	10,1749	-101,9335	-4,9742	-0,1950
9	-7,5845	-7,5845	-7,5845	-26,9415	-32,2677	-59,2092	4,1767	-89,0000	-4,0583	-0,1945
10	-7,5807	-7,5807	-7,5807	-15,4794	-38,8015	-54,2809	12,8185	-78,3014	-3,1061	-0,1944
11	-7,5767	-7,5767	-7,5767	-31,5722	-22,8222	-54,3944	4,7801	-93,7173	-4,4745	-0,1943
12	-7,5584	-7,5584	-7,5584	-28,3510	-29,6790	-58,0299	3,8117	-96,5158	-4,6781	-0,1938
13	-7,5408	-7,5408	-7,5408	-30,7302	-30,1223	-60,8526	8,4198	-92,7721	-5,0916	-0,1934
14	-7,3236	-7,3236	-7,3236	-31,6327	-28,9524	-60,5851	10,0256	-87,7898	-4,2079	-0,1878
15	-7,2895	-7,2895	-7,2895	-31,9584	-25,3970	-57,3554	11,1050	-82,9067	-4,5114	-0,1869
16	-7,1249	-7,1249	-7,1249	-34,8177	-27,6461	-62,4638	0,0000	-89,3815	-3,5905	-0,1827
17	-7,0118	-7,0118	-7,0118	-37,6728	-21,1258	-58,7986	5,9855	-89,5239	-4,9502	-0,1798
18	-6,9975	-6,9975	-6,9975	-31,0368	-27,7504	-58,7872	6,2088	-83,5398	-3,7129	-0,1794
19	-6,7884	-6,7884	-6,7884	-34,8158	-28,7901	-63,6059	8,7285	-95,0625	-3,7351	-0,1741
20	-6,7686	-6,7686	-6,7686	-19,4643	-26,5287	-45,9930	0,0000	-75,7739	-4,5131	-0,1736
21	-6,6878	-6,6878	-6,6878	-23,9149	-32,1773	-56,0922	5,8775	-85,9328	-4,6066	-0,1715
22	-6,6118	-6,6118	-6,6118	-36,2377	-24,0369	-60,2746	13,5428	-88,2844	-3,3271	-0,1695
23	-6,5445	-6,5445	-6,5445	-25,1622	-29,3937	-54,5559	0,0000	-86,7221	-4,3117	-0,1678
24	-6,5269	-6,5269	-6,5269	-34,2628	-24,0244	-58,2871	0,0000	-91,9744	-3,2543	-0,1674
25	-6,4116	-6,4116	-6,4116	-28,6118	-24,5881	-53,1999	7,8017	-87,9092	-3,4864	-0,1644
26	-6,3198	-6,3198	-6,3198	-29,1219	-19,2979	-48,4198	8,3834	-68,2153	-3,2919	-0,1620
27	-6,2971	-6,2971	-6,2971	-35,6204	-17,9454	-53,5658	6,1173	-76,8394	-4,5178	-0,1615
28	-6,1588	-6,1588	-6,1588	-34,6417	-22,6962	-57,3379	11,1741	-70,9140	-2,1618	-0,1579
29	-6,1309	-6,1309	-6,1309	-34,2494	-18,8110	-53,0604	3,5495	-78,4838	-2,6741	-0,1572
30	-5,9100	-5,9100	-5,9100	-30,5277	-20,9023	-51,4300	5,2592	-78,7429	-2,7701	-0,1515
31	-5,8915	-5,8915	-5,8915	-30,6705	-21,7815	-52,4520	2,8264	-76,6276	-3,4755	-0,1511
32	-5,4740	-5,4740	-5,4740	-27,3017	-19,1485	-46,4502	5,2029	-71,8713	-3,1077	-0,1404

Tab. 33: Docking-Ergebnis für Ligand **27** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,2737	-9,2737	-9,2737	-26,3087	-38,3634	-64,6721	10,5016	-95,0112	-5,8494	-0,2318
2	-9,1221	-9,1221	-9,1221	-23,6675	-37,4338	-61,1012	2,9071	-98,9857	-5,4328	-0,2281
3	-8,8442	-8,8442	-8,8442	-27,0902	-36,2273	-63,3175	6,3781	-93,7934	-5,5313	-0,2211
4	-8,3854	-8,3854	-8,3854	-28,2371	-30,7707	-59,0078	12,5095	-91,2389	-4,7939	-0,2096
5	-8,3338	-8,3338	-8,3338	-15,7784	-39,7152	-55,4936	9,1292	-93,8781	-4,1765	-0,2083
6	-8,2452	-8,2452	-8,2452	-28,5790	-26,5857	-55,1647	8,9866	-89,1032	-4,3911	-0,2061
7	-8,1555	-8,1555	-8,1555	-28,9814	-28,6611	-57,6424	7,2139	-87,2492	-5,5614	-0,2039
8	-8,1386	-8,1386	-8,1386	-25,4009	-33,2373	-58,6382	6,6499	-85,8819	-4,2998	-0,2035
9	-7,9707	-7,9707	-7,9707	-23,9930	-41,0687	-65,0617	0,0000	-86,1181	-4,9255	-0,1993
10	-7,9657	-7,9657	-7,9657	-27,4441	-33,8321	-61,2762	12,0745	-88,4027	-4,2665	-0,1991
11	-7,8688	-7,8688	-7,8688	-29,4048	-31,8494	-61,2543	7,4767	-85,9970	-5,4403	-0,1967
12	-7,6596	-7,6596	-7,6596	-22,3708	-35,3390	-57,7098	5,9234	-91,7441	-4,1336	-0,1915
13	-7,3718	-7,3718	-7,3718	-22,5052	-37,3270	-59,8322	12,0516	-74,4202	-5,5820	-0,1843
14	-7,3408	-7,3408	-7,3408	-24,3888	-30,0759	-54,4647	5,2225	-85,9763	-4,8711	-0,1835
15	-7,3264	-7,3264	-7,3264	-26,1554	-32,6613	-58,8166	10,3889	-80,9002	-3,1514	-0,1832
16	-7,3092	-7,3092	-7,3092	-22,7839	-30,3127	-53,0966	6,1482	-80,6733	-4,2500	-0,1827
17	-7,2614	-7,2614	-7,2614	-27,7342	-28,6954	-56,4297	-11,1626	-95,9732	-4,4106	-0,1815
18	-7,1611	-7,1611	-7,1611	-32,8061	-25,0563	-57,8624	11,2725	-76,7648	-2,9835	-0,1790
19	-6,8269	-6,8269	-6,8269	-27,8941	-29,4633	-57,3574	13,4610	-68,6146	-3,3600	-0,1707
20	-6,5992	-6,5992	-6,5992	-24,8497	-27,8081	-52,6577	0,0000	-72,0282	-3,4281	-0,1650
21	-6,3814	-6,3814	-6,3814	-24,3724	-26,8451	-51,2175	0,0000	-82,4335	-4,3544	-0,1595
22	-6,1367	-6,1367	-6,1367	-30,5986	-28,6669	-59,2654	14,5379	-78,5090	-2,2457	-0,1534
23	-6,1109	-6,1109	-6,1109	-26,0202	-24,9045	-50,9247	8,5238	-70,6644	-3,2205	-0,1528
24	-6,0323	-6,0323	-6,0323	-32,3425	-22,5840	-54,9265	7,9893	-80,5069	-3,9064	-0,1508
25	-5,6512	-5,6512	-5,6512	-25,9243	-28,5724	-54,4968	6,9735	-69,3143	-2,9489	-0,1413
26	-5,5822	-5,5822	-5,5822	-34,9611	-21,9009	-56,8620	6,5418	-81,6508	-2,7388	-0,1396
27	-5,2629	-5,2629	-5,2629	-31,3766	-23,8203	-55,1969	7,5301	-74,3596	-3,0879	-0,1316
28	-5,1953	-5,1953	-5,1953	-30,8608	-19,6924	-50,5532	6,4653	-73,0871	-2,4152	-0,1299
29	-4,9756	-4,9756	-4,9756	-29,8419	-17,5792	-47,4211	3,7707	-58,8241	-2,0946	-0,1244
30	-4,9724	-4,9724	-4,9724	-30,4720	-24,0124	-54,4844	6,8746	-74,9858	-1,7319	-0,1243
31	-4,4639	-4,4639	-4,4639	-30,1311	-19,6847	-49,8158	9,7389	-59,2817	-2,2350	-0,1116
32	-3,9791	-3,9791	-3,9791	-27,2301	-11,2740	-38,5041	4,4160	-51,1235	-0,4049	-0,0995

Tab.: 34: Docking-Ergebnis für Ligand **27** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide vdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,5020	-9,5020	-9,5020	-28,8510	-33,7700	-62,6210	6,0840	-107,0620	-5,6860	-0,2380
2	-8,5490	-8,5490	-8,5490	-35,9650	-33,4760	-69,4420	9,0880	-102,3890	-5,7260	-0,2140
3	-8,1460	-8,1460	-8,1460	-37,3800	-27,5800	-64,9600	5,7060	-101,0310	-5,0490	-0,2040

4	-8,0930	-8,0930	-8,0930	-36,8060	-30,5850	-67,3910	10,9080	-107,0680	-5,1980	-0,2020
5	-7,7330	-7,7330	-7,7330	-21,2380	-31,4440	-52,6810	5,0300	-99,8890	-4,4570	-0,1930
6	-7,5200	-7,5200	-7,5200	-35,0980	-25,9890	-61,0870	13,1390	-99,7080	-3,6050	-0,1880
7	-7,4470	-7,4470	-7,4470	-33,4700	-32,2320	-65,7010	7,5560	-103,5240	-4,4940	-0,1860
8	-7,4370	-7,4370	-7,4370	-29,1990	-34,2750	-63,4740	9,4630	-96,1710	-4,2720	-0,1860
9	-7,4080	-7,4080	-7,4080	-35,6690	-24,6960	-60,3650	12,6530	-91,6400	-4,4510	-0,1850
10	-7,3200	-7,3200	-7,3200	-30,8290	-30,9980	-61,8270	3,9430	-99,8930	-4,2900	-0,1830
11	-7,2890	-7,2890	-7,2890	-16,3460	-32,2220	-48,5680	5,9910	-77,4670	-3,1130	-0,1820
12	-7,2340	-7,2340	-7,2340	-31,9570	-28,9490	-60,9060	-10,0260	-101,5440	-4,5820	-0,1810
13	-7,1700	-7,1700	-7,1700	-32,2150	-22,9480	-55,1630	0,0000	-86,0920	-4,9250	-0,1790
14	-7,1560	-7,1560	-7,1560	-24,2290	-22,1490	-46,3780	3,7530	-76,1240	-4,4980	-0,1790
15	-7,1540	-7,1540	-7,1540	-37,1290	-25,1540	-62,2820	17,1000	-87,7060	-3,8880	-0,1790
16	-7,1200	-7,1200	-7,1200	-34,9980	-27,0020	-62,0010	11,9010	-96,2300	-4,3780	-0,1780
17	-6,8530	-6,8530	-6,8530	-32,0410	-29,9400	-61,9810	3,5800	-93,5650	-3,7080	-0,1710
18	-6,8410	-6,8410	-6,8410	-35,1530	-26,7520	-61,9050	11,7810	-91,1850	-4,2290	-0,1710
19	-6,8050	-6,8050	-6,8050	-31,0070	-26,7510	-57,7570	0,0000	-87,0860	-3,7080	-0,1700
20	-6,6710	-6,6710	-6,6710	-31,9850	-26,1520	-58,1370	3,8190	-87,6550	-4,0590	-0,1670
21	-6,6560	-6,6560	-6,6560	-30,0460	-27,9750	-58,0210	3,2890	-95,6990	-3,7220	-0,1660
22	-6,6360	-6,6360	-6,6360	-33,6050	-22,2220	-55,8270	7,0530	-78,9900	-3,0580	-0,1660
23	-6,5640	-6,5640	-6,5640	-34,9570	-23,8160	-58,7730	8,2740	-87,6640	-2,2510	-0,1640
24	-6,4400	-6,4400	-6,4400	-29,9010	-24,6050	-54,5060	7,5660	-81,7610	-3,7730	-0,1610
25	-6,2040	-6,2040	-6,2040	-28,3640	-26,1540	-54,5180	7,5910	-80,3580	-4,3790	-0,1550
26	-6,1780	-6,1780	-6,1780	-32,6840	-20,8960	-53,5800	5,2250	-78,1010	-3,3010	-0,1540
27	-6,1690	-6,1690	-6,1690	-35,2440	-25,1420	-60,3860	7,5830	-92,8090	-3,3780	-0,1540
28	-6,0160	-6,0160	-6,0160	-21,9400	-24,6070	-46,5470	0,0000	-73,2280	-3,3000	-0,1500
29	-5,8600	-5,8600	-5,8600	-38,8050	-20,7070	-59,5110	3,4260	-85,3740	-2,9710	-0,1470
30	-5,8580	-5,8580	-5,8580	-30,3950	-20,7250	-51,1200	0,0000	-79,2600	-1,9970	-0,1460
31	-5,8380	-5,8380	-5,8380	-32,2880	-20,3630	-52,6510	9,6160	-71,8670	-2,8530	-0,1460
32	-4,8280	-4,8280	-4,8280	-28,5270	-18,8880	-47,4150	14,0960	-68,5270	-1,7890	-0,1210

Tab. 35: Docking-Ergebnis für Ligand **52-Int** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	Glide ligand efficiency
1	-7,7708	-7,7708	-7,7708	-36,1108	-34,8603	-70,9710	0,0000	-114,9376	-3,7568	-0,1619
2	-7,5822	-7,5822	-7,5822	-22,7616	-33,7736	-56,5352	10,8178	-80,6531	-4,2290	-0,1580
3	-6,5819	-6,5819	-6,5819	-35,3939	-20,7872	-56,1811	9,9676	-79,3089	-2,5978	-0,1371
4	-6,2107	-6,2107	-6,2107	-30,8649	-21,6582	-52,5231	6,1856	-81,7541	-2,9124	-0,1294
5	-6,1566	-6,1566	-6,1566	-34,0465	-10,1316	-44,1781	7,0759	-59,4565	-1,9200	-0,1283
6	-5,8863	-5,8863	-5,8863	-38,8022	-12,7801	-51,5823	16,9048	-71,2437	-2,7440	-0,1226
7	-5,4000	-5,4000	-5,4000	-41,2114	-13,0636	-54,2750	4,2588	-64,7257	-3,1200	-0,1125

8	-5,2837	-5,2837	-5,2837	-33,1508	-14,1844	-47,3351	4,1268	-64,7545	-1,7550	-0,1101
9	-5,0609	-5,0609	-5,0609	-39,9588	-13,0915	-53,0503	6,0103	-72,7444	-1,6355	-0,1054
10	-4,8745	-4,8745	-4,8745	-33,6020	-17,2911	-50,8930	2,0558	-72,3304	-2,4466	-0,1016
11	-4,6475	-4,6475	-4,6475	-33,0813	-13,8682	-46,9495	6,9212	-64,0156	-1,4786	-0,0968
12	-4,6053	-4,6053	-4,6053	-38,1195	-14,5927	-52,7122	9,8809	-76,1808	-1,0723	-0,0959
13	-4,5304	-4,5304	-4,5304	-38,6175	-7,9559	-46,5735	7,2254	-67,8398	-1,6121	-0,0944
14	-4,4156	-4,4156	-4,4156	-37,0942	-14,9047	-51,9989	9,4594	-77,5758	-1,9200	-0,0920
15	-4,4149	-4,4149	-4,4149	-41,2461	-15,8553	-57,1014	11,4578	-71,6748	-1,5934	-0,0920
16	-4,3506	-4,3506	-4,3506	-42,8560	-11,2087	-54,0647	3,1319	-76,5600	-2,0667	-0,0906
17	-4,2177	-4,2177	-4,2177	-30,5339	-15,4353	-45,9692	7,2403	-66,7222	-0,7950	-0,0879
18	-4,1019	-4,1019	-4,1019	-38,1264	-11,8569	-49,9833	4,9845	-71,8316	-2,0261	-0,0855
19	-4,0880	-4,0880	-4,0880	-33,9501	-11,8337	-45,7838	6,8635	-62,5976	-0,9497	-0,0852
20	-4,0211	-4,0211	-4,0211	-39,2554	-12,0605	-51,3159	2,6053	-75,1601	-1,2687	-0,0838
21	-3,9129	-3,9129	-3,9129	-36,5636	-15,7197	-52,2833	5,7997	-77,3247	-1,7812	-0,0815
22	-3,8857	-3,8857	-3,8857	-42,0935	-12,9462	-55,0397	3,1904	-76,9702	-1,1860	-0,0810
23	-3,8445	-3,8445	-3,8445	-39,9465	-12,5998	-52,5464	0,0000	-76,1774	-1,3137	-0,0801
24	-3,8033	-3,8033	-3,8033	-36,4411	-10,2753	-46,7164	9,6619	-65,5360	-0,8045	-0,0792
25	-3,8033	-3,8033	-3,8033	-36,6679	-16,4295	-53,0974	7,2930	-76,5398	-2,0065	-0,0792
26	-3,7558	-3,7558	-3,7558	-37,3970	-13,3291	-50,7262	6,7584	-68,8901	-1,7426	-0,0782
27	-3,7505	-3,7505	-3,7505	-34,0708	-17,3330	-51,4038	2,3106	-74,6849	-2,3739	-0,0781
28	-3,6672	-3,6672	-3,6672	-32,4816	-15,0948	-47,5764	0,0000	-69,7999	-3,5387	-0,0764
29	-3,6489	-3,6489	-3,6489	-31,0580	-13,5717	-44,6297	10,0404	-64,4162	-1,4551	-0,0760
30	-3,3386	-3,3386	-3,3386	-40,1300	-6,8138	-46,9439	7,7480	-66,8131	-1,4104	-0,0696
31	-3,3224	-3,3224	-3,3224	-34,3355	-12,3723	-46,7078	8,5768	-75,4531	-0,4103	-0,0692
32	-1,2293	-1,2293	-1,2293	-38,8990	-7,6199	-46,5190	5,7537	-68,3095	-2,0250	-0,0256

Tab. 36: Docking-Ergebnis für Ligand **52-Int** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-9,3931	-9,3931	-9,3931	-38,0094	-30,8738	-68,8832	6,3862	-118,0592	-5,5779	-0,1957
2	-8,3140	-8,3140	-8,3140	-34,0066	-28,4006	-62,4072	6,1681	-98,9001	-3,8699	-0,1732
3	-8,2822	-8,2822	-8,2822	-38,7676	-24,5559	-63,3235	5,6790	-105,6547	-4,2014	-0,1725
4	-8,2285	-8,2285	-8,2285	-32,7102	-30,3802	-63,0904	6,9872	-109,3027	-4,3962	-0,1714
5	-8,1738	-8,1738	-8,1738	-30,3514	-32,7215	-63,0729	10,4357	-94,9869	-4,5660	-0,1703
6	-8,1175	-8,1175	-8,1175	-38,6060	-28,8240	-67,4300	2,2071	-116,0830	-5,0121	-0,1691
7	-7,8296	-7,8296	-7,8296	-35,5090	-33,8280	-69,3370	7,5786	-99,5299	-4,1459	-0,1631
8	-7,7215	-7,7215	-7,7215	-42,4657	-29,5178	-71,9836	4,1615	-112,4658	-4,9362	-0,1609
9	-7,7163	-7,7163	-7,7163	-35,1507	-26,0811	-61,2318	0,0000	-91,1863	-4,0582	-0,1608
10	-7,6249	-7,6249	-7,6249	-42,9100	-23,3362	-66,2462	8,1557	-106,7283	-3,4955	-0,1589
11	-7,6086	-7,6086	-7,6086	-38,5423	-25,5166	-64,0589	0,0000	-118,1139	-4,4962	-0,1585
12	-7,5378	-7,5378	-7,5378	-43,8475	-21,0030	-64,8504	0,0000	-88,5373	-4,4505	-0,1570

13	-7,4450	-7,4450	-7,4450	-36,3937	-22,2636	-58,6573	11,4984	-97,7039	-3,7840	-0,1551
14	-7,3073	-7,3073	-7,3073	-34,3097	-30,5596	-64,8693	7,1638	-106,3390	-4,7101	-0,1522
15	-7,2043	-7,2043	-7,2043	-32,9293	-25,4978	-58,4271	7,2876	-96,2344	-3,7082	-0,1501
16	-7,1117	-7,1117	-7,1117	-38,5034	-25,0508	-63,5542	5,9995	-93,7571	-3,2603	-0,1482
17	-7,0715	-7,0715	-7,0715	-36,7324	-26,4392	-63,1716	14,0945	-90,6772	-3,1735	-0,1473
18	-6,9217	-6,9217	-6,9217	-39,4176	-22,9636	-62,3811	4,3502	-93,9097	-3,6140	-0,1442
19	-6,9125	-6,9125	-6,9125	-41,9599	-27,6307	-69,5906	6,5388	-114,0128	-3,5057	-0,1440
20	-6,5375	-6,5375	-6,5375	-32,1615	-22,4340	-54,5955	8,2590	-82,2112	-2,7031	-0,1362
21	-6,5292	-6,5292	-6,5292	-38,6191	-20,1665	-58,7856	6,2979	-103,6572	-3,3737	-0,1360
22	-6,4374	-6,4374	-6,4374	-37,6222	-21,9403	-59,5625	6,2667	-100,4530	-3,1897	-0,1341
23	-6,3758	-6,3758	-6,3758	-33,6066	-29,5443	-63,1508	3,7763	-99,7576	-4,0633	-0,1328
24	-6,3378	-6,3378	-6,3378	-37,0837	-22,1613	-59,2450	5,5734	-82,4217	-2,9867	-0,1320
25	-6,2115	-6,2115	-6,2115	-41,1673	-25,2638	-66,4310	0,0000	-96,2614	-3,4828	-0,1294
26	-6,1675	-6,1675	-6,1675	-39,9622	-18,7774	-58,7396	0,0000	-90,8568	-2,7442	-0,1285
27	-6,1017	-6,1017	-6,1017	-31,9838	-20,6002	-52,5840	6,1846	-83,9118	-2,5320	-0,1271
28	-5,8431	-5,8431	-5,8431	-37,7148	-16,5516	-54,2664	13,3839	-80,6672	-2,8870	-0,1217
29	-5,6393	-5,6393	-5,6393	-32,7098	-22,2666	-54,9764	8,1370	-88,6505	-3,1251	-0,1175
30	-5,4053	-5,4053	-5,4053	-42,8443	-20,6034	-63,4477	0,0000	-96,1228	-2,9468	-0,1126
31	-5,3247	-5,3247	-5,3247	-38,5154	-21,9674	-60,4827	8,6778	-102,2183	-4,0771	-0,1109
32	-5,1097	-5,1097	-5,1097	-35,6140	-18,8737	-54,4877	0,0000	-82,5022	-2,8705	-0,1065

Tab. 37: Docking-Ergebnis für Ligand **53-Int** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-6,7923	-6,7923	-6,7923	-40,3274	-19,1278	-59,4552	17,1469	-91,5803	-1,1923	-0,1213
2	-6,5689	-6,5689	-6,5689	-49,5580	-8,7916	-58,3496	7,9051	-80,4774	-2,5739	-0,1173
3	-6,0845	-6,0845	-6,0845	-45,7675	-14,0336	-59,8011	8,8897	-91,4842	-1,7754	-0,1087
4	-5,9240	-5,9240	-5,9240	-47,8532	-9,5419	-57,3951	7,2281	-82,4846	-2,4302	-0,1058
5	-5,9002	-5,9002	-5,9002	-47,8697	-8,3345	-56,2042	11,5807	-77,8190	-1,9438	-0,1054
6	-5,6284	-5,6284	-5,6284	-44,2988	-9,9082	-54,2070	8,0080	-79,4248	-1,6028	-0,1005
7	-5,6118	-5,6118	-5,6118	-44,0502	-10,6644	-54,7146	8,6972	-74,3846	-1,9666	-0,1002
8	-5,5798	-5,5798	-5,5798	-46,4350	-15,5667	-62,0016	12,3492	-88,8660	-2,0757	-0,0996
9	-5,5450	-5,5450	-5,5450	-49,2542	-10,4682	-59,7224	12,1304	-76,8909	-1,8613	-0,0990
10	-5,5409	-5,5409	-5,5409	-47,2159	-9,5682	-56,7841	11,1635	-77,1764	-1,4400	-0,0989
11	-5,4009	-5,4009	-5,4009	-48,6769	-9,8850	-58,5619	8,0327	-78,0474	-1,5016	-0,0964
12	-5,1747	-5,1747	-5,1747	-49,0473	-4,0228	-53,0701	7,6497	-78,6723	-1,9385	-0,0924
13	-5,1246	-5,1246	-5,1246	-49,7588	-14,7163	-64,4751	12,4192	-87,3341	-2,3542	-0,0915
14	-4,8547	-4,8547	-4,8547	-38,0495	-12,0256	-50,0752	4,3525	-81,3772	-2,2458	-0,0867
15	-4,8408	-4,8408	-4,8408	-43,5348	-16,8609	-60,3957	7,4053	-93,4140	-2,7945	-0,0864
16	-4,7974	-4,7974	-4,7974	-46,3027	-16,1675	-62,4701	14,2186	-83,0993	-1,1670	-0,0857
17	-4,7042	-4,7042	-4,7042	-47,6421	-13,3806	-61,0227	14,2657	-83,5675	-0,9600	-0,0840

18	-4,3093	-4,3093	-4,3093	-46,2411	-13,4138	-59,6549	11,9695	-84,3244	-1,5906	-0,0770
19	-4,2694	-4,2694	-4,2694	-43,9173	-14,8639	-58,7811	11,8598	-88,3056	-0,7459	-0,0762
20	-4,2456	-4,2456	-4,2456	-39,4859	-17,5434	-57,0293	11,1297	-79,2960	-0,7950	-0,0758
21	-4,2130	-4,2130	-4,2130	-44,0636	-15,2737	-59,3373	0,0000	-80,8470	-1,2049	-0,0752
22	-4,1380	-4,1380	-4,1380	-47,0092	-12,9314	-59,9406	11,0290	-82,5208	-1,8851	-0,0739
23	-4,0585	-4,0585	-4,0585	-40,0953	-12,1438	-52,2391	8,0333	-80,3974	-0,4871	-0,0725
24	-4,0492	-4,0492	-4,0492	-46,7977	-11,3097	-58,1074	0,0000	-87,2012	-1,5277	-0,0723
25	-3,8416	-3,8416	-3,8416	-46,7548	-15,3409	-62,0957	0,0000	-99,9865	-1,5411	-0,0686
26	-3,4007	-3,4007	-3,4007	-46,8100	-12,5107	-59,3207	8,8436	-79,7708	-1,3083	-0,0607
27	-2,9389	-2,9389	-2,9389	-38,1642	-19,3432	-57,5074	7,2545	-85,1517	-1,0051	-0,0525
28	-2,7176	-2,7176	-2,7176	-42,6741	-8,5244	-51,1986	9,8798	-75,7718	-0,6229	-0,0485
29	-2,7096	-2,7096	-2,7096	-41,1883	-12,7871	-53,9754	0,0000	-83,8916	-1,4527	-0,0484
30	-2,6448	-2,6448	-2,6448	-48,6198	-10,4219	-59,0417	6,4351	-85,4105	-1,1945	-0,0472
31	-2,0700	-2,0700	-2,0700	-48,1024	-9,8589	-57,9613	9,5028	-83,5947	-1,3700	-0,0370
32	-0,8781	-0,8781	-0,8781	-44,8445	-10,4516	-55,2962	9,9196	-86,0693	-0,9304	-0,0157

Tab. 38: Docking-Ergebnis für Ligand **53-Int** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-8,9406	-8,9406	-8,9406	-33,4708	-43,9027	-77,3735	9,5800	-120,4108	-4,2416	-0,1597
2	-8,9209	-8,9209	-8,9209	-43,9465	-30,2845	-74,2310	11,1244	-127,0085	-4,2264	-0,1593
3	-8,8790	-8,8790	-8,8790	-43,3046	-32,9901	-76,2947	0,0000	-115,5939	-4,4532	-0,1586
4	-8,8488	-8,8488	-8,8488	-43,8666	-31,9212	-75,7878	0,0000	-122,7806	-5,0247	-0,1580
5	-8,5373	-8,5373	-8,5373	-42,5434	-27,7942	-70,3376	2,7819	-116,4908	-4,6803	-0,1525
6	-8,5167	-8,5167	-8,5167	-42,1757	-29,9052	-72,0809	9,7413	-118,7091	-4,5350	-0,1521
7	-8,1530	-8,1530	-8,1530	-39,7006	-26,9522	-66,6528	9,9665	-101,1303	-3,7358	-0,1456
8	-7,9974	-7,9974	-7,9974	-40,3718	-32,4009	-72,7727	5,7158	-118,0206	-4,7677	-0,1428
9	-7,9358	-7,9358	-7,9358	-46,1001	-24,5034	-70,6035	4,7000	-112,9878	-4,0540	-0,1417
10	-7,9160	-7,9160	-7,9160	-38,0141	-23,9341	-61,9482	9,4228	-91,7977	-3,2040	-0,1414
11	-7,7177	-7,7177	-7,7177	-44,0323	-26,0800	-70,1123	0,0000	-111,9282	-4,3413	-0,1378
12	-7,6209	-7,6209	-7,6209	-36,7319	-32,5090	-69,2408	7,9637	-117,6918	-4,8758	-0,1361
13	-7,6088	-7,6088	-7,6088	-41,5022	-27,4273	-68,9295	5,9410	-115,5661	-3,9300	-0,1359
14	-7,4529	-7,4529	-7,4529	-42,7315	-29,7217	-72,4532	7,4123	-114,5981	-4,5334	-0,1331
15	-7,4268	-7,4268	-7,4268	-36,3056	-23,4310	-59,7366	5,2430	-91,8389	-4,0361	-0,1326
16	-7,4258	-7,4258	-7,4258	-43,0093	-28,7626	-71,7719	9,9858	-117,9527	-3,2901	-0,1326
17	-7,3065	-7,3065	-7,3065	-33,6959	-26,6508	-60,3467	0,0000	-99,7202	-3,9239	-0,1305
18	-7,2499	-7,2499	-7,2499	-39,9655	-27,5721	-67,5376	5,3793	-104,5845	-4,1767	-0,1295
19	-7,1982	-7,1982	-7,1982	-46,1330	-19,7660	-65,8990	7,8248	-111,5080	-4,2033	-0,1285
20	-7,0895	-7,0895	-7,0895	-33,9609	-30,8202	-64,7811	4,7382	-103,3501	-4,0770	-0,1266
21	-7,0692	-7,0692	-7,0692	-34,3257	-21,8532	-56,1789	6,4107	-98,9344	-4,3248	-0,1262
22	-6,9068	-6,9068	-6,9068	-38,7607	-19,0678	-57,8285	12,5918	-88,5199	-3,4145	-0,1233

23	-6,8264	-6,8264	-6,8264	-45,8033	-18,9008	-64,7041	0,0000	-98,6436	-4,1593	-0,1219
24	-6,7282	-6,7282	-6,7282	-36,0160	-22,9055	-58,9215	7,3679	-93,8356	-2,2179	-0,1201
25	-6,4661	-6,4661	-6,4661	-46,7677	-17,5977	-64,3655	0,0000	-106,9200	-3,0090	-0,1155
26	-6,3999	-6,3999	-6,3999	-39,1794	-27,9935	-67,1729	17,0842	-98,1914	-3,5844	-0,1143
27	-6,0924	-6,0924	-6,0924	-36,3456	-23,9001	-60,2457	3,0809	-92,3949	-0,6168	-0,1088
28	-5,7330	-5,7330	-5,7330	-32,3378	-22,8356	-55,1734	0,0000	-76,1029	-1,8056	-0,1024
29	-5,7011	-5,7011	-5,7011	-35,9684	-16,9590	-52,9274	0,0000	-86,6290	-1,2510	-0,1018
30	-5,6536	-5,6536	-5,6536	-40,4199	-18,5852	-59,0050	10,0121	-89,8404	-3,3143	-0,1010
31	-5,4099	-5,4099	-5,4099	-44,7803	-16,0123	-60,7926	7,2752	-99,4611	-1,0437	-0,0966
32	-4,9623	-4,9623	-4,9623	-43,3992	-16,3135	-59,7127	0,0000	-91,0798	-1,9931	-0,0886

Tab. 39: Docking-Ergebnis für Ligand **54-Int** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-5,9061	-5,9061	-5,9061	-45,5937	-15,6506	-61,2443	7,1033	-91,0310	-2,0744	-0,1094
2	-5,4689	-5,4689	-5,4689	-44,1790	-15,9791	-60,1581	17,0812	-87,2850	-1,1532	-0,1013
3	-5,3946	-5,3946	-5,3946	-38,0029	-13,3223	-51,3252	11,7801	-78,2182	-2,4546	-0,0999
4	-5,3882	-5,3882	-5,3882	-44,5193	-8,5021	-53,0214	4,4299	-80,8129	-2,0170	-0,0998
5	-5,1417	-5,1417	-5,1417	-44,1221	-14,3519	-58,4740	7,8270	-80,7715	-2,0592	-0,0952
6	-5,0717	-5,0717	-5,0717	-38,7677	-18,5165	-57,2842	6,6423	-84,7993	-2,4048	-0,0939
7	-4,9918	-4,9918	-4,9918	-43,8923	-10,6389	-54,5312	6,0109	-80,6398	-1,8915	-0,0924
8	-4,9704	-4,9704	-4,9704	-44,6028	-8,5237	-53,1265	3,3073	-79,3513	-2,4568	-0,0920
9	-4,9082	-4,9082	-4,9082	-45,8461	-17,9435	-63,7896	7,1116	-94,6827	-1,6917	-0,0909
10	-4,8743	-4,8743	-4,8743	-44,9035	-8,2178	-53,1213	4,6861	-79,9299	-2,1430	-0,0903
11	-4,8734	-4,8734	-4,8734	-44,3169	-7,6111	-51,9280	3,9793	-79,4462	-1,7767	-0,0902
12	-4,8615	-4,8615	-4,8615	-44,7207	-10,8902	-55,6109	6,3947	-79,7017	-1,3422	-0,0900
13	-4,6801	-4,6801	-4,6801	-44,2337	-9,5242	-53,7579	0,0000	-83,2421	-2,0669	-0,0867
14	-4,6288	-4,6288	-4,6288	-43,6407	-15,5046	-59,1453	0,0000	-84,2156	-1,4400	-0,0857
15	-4,6229	-4,6229	-4,6229	-40,6333	-12,5395	-53,1728	0,0000	-83,0356	-1,5625	-0,0856
16	-4,5619	-4,5619	-4,5619	-45,0274	-13,3163	-58,3437	10,6091	-80,1278	-2,0649	-0,0845
17	-4,5315	-4,5315	-4,5315	-43,2360	-10,0718	-53,3078	8,2887	-78,2341	-1,8506	-0,0839
18	-4,4976	-4,4976	-4,4976	-38,8516	-13,5000	-52,3517	8,0261	-80,3905	-0,7527	-0,0833
19	-4,4922	-4,4922	-4,4922	-43,3781	-14,6778	-58,0559	8,2875	-87,5436	-0,9815	-0,0832
20	-4,4760	-4,4760	-4,4760	-40,9323	-10,6144	-51,5467	14,5101	-74,7886	-1,4400	-0,0829
21	-4,4281	-4,4281	-4,4281	-40,2155	-9,2493	-49,4647	7,5753	-76,6911	-1,0598	-0,0820
22	-4,3530	-4,3530	-4,3530	-41,1844	-14,4753	-55,6597	3,6654	-80,0642	-1,6742	-0,0806
23	-4,3323	-4,3323	-4,3323	-34,0756	-12,4572	-46,5328	6,9339	-75,7860	-1,7554	-0,0802
24	-4,3107	-4,3107	-4,3107	-41,5080	-13,5103	-55,0183	12,2472	-79,7995	-1,3965	-0,0798
25	-4,2999	-4,2999	-4,2999	-40,0056	-14,5399	-54,5454	11,6577	-78,6977	-1,5035	-0,0796
26	-4,2825	-4,2825	-4,2825	-37,4290	-16,7248	-54,1539	12,7494	-76,1463	-2,1400	-0,0793

27	-4,2253	-4,2253	-4,2253	-36,4813	-17,5121	-53,9934	12,4056	-87,1616	-1,4400	-0,0782
28	-4,1702	-4,1702	-4,1702	-41,1426	-15,4320	-56,5746	11,9317	-81,6353	-1,1541	-0,0772
29	-3,8381	-3,8381	-3,8381	-31,9541	-15,3370	-47,2912	8,1164	-71,5389	-1,7069	-0,0711
30	-3,7461	-3,7461	-3,7461	-41,1866	-13,0413	-54,2279	8,0922	-78,1938	-2,3377	-0,0694
31	-3,3410	-3,3410	-3,3410	-45,1168	-8,1257	-53,2425	13,6461	-72,7176	-0,5139	-0,0619
32	-2,6172	-2,6172	-2,6172	-38,8045	-14,1387	-52,9431	3,0621	-78,3726	-1,0771	-0,0485

Tab. 40: Docking-Ergebnis für Ligand **54-Int.** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-8,5194	-8,5194	-8,5194	-43,7257	-30,7392	-74,4649	8,4578	-130,8282	-5,2737	-0,1578
2	-8,4982	-8,4982	-8,4982	-40,6564	-29,8190	-70,4753	6,8992	-117,0393	-4,6166	-0,1574
3	-8,3502	-8,3502	-8,3502	-44,7087	-26,9299	-71,6385	3,4831	-115,3740	-4,6308	-0,1546
4	-8,1156	-8,1156	-8,1156	-49,2506	-21,7424	-70,9930	10,7746	-109,5500	-5,0413	-0,1503
5	-7,9920	-7,9920	-7,9920	-35,7189	-27,5924	-63,3113	0,0000	-104,7181	-4,2327	-0,1480
6	-7,6738	-7,6738	-7,6738	-38,3311	-32,3584	-70,6896	7,0710	-119,1052	-4,7264	-0,1421
7	-7,6277	-7,6277	-7,6277	-35,1725	-30,5062	-65,6787	13,0333	-104,0448	-4,3395	-0,1413
8	-7,6110	-7,6110	-7,6110	-33,5109	-23,2012	-56,7121	0,0000	-96,8406	-3,7083	-0,1409
9	-7,3242	-7,3242	-7,3242	-38,8964	-24,5882	-63,4846	0,0000	-105,3027	-3,7081	-0,1356
10	-7,3098	-7,3098	-7,3098	-35,7298	-27,0973	-62,8270	0,0000	-110,0918	-3,6357	-0,1354
11	-7,2859	-7,2859	-7,2859	-33,3395	-30,1793	-63,5188	6,5936	-102,9130	-3,7084	-0,1349
12	-7,2748	-7,2748	-7,2748	-42,0605	-23,8133	-65,8738	4,6940	-116,2213	-4,4206	-0,1347
13	-7,2614	-7,2614	-7,2614	-40,9944	-21,7355	-62,7298	0,0000	-101,8186	-3,1822	-0,1345
14	-7,1319	-7,1319	-7,1319	-45,5024	-28,0544	-73,5568	11,2481	-123,5361	-3,9437	-0,1321
15	-7,0960	-7,0960	-7,0960	-38,6788	-27,7986	-66,4774	5,4854	-114,7900	-4,2401	-0,1314
16	-6,9118	-6,9118	-6,9118	-40,3323	-24,7957	-65,1280	2,5055	-110,0782	-3,6742	-0,1280
17	-6,8726	-6,8726	-6,8726	-32,7980	-26,2315	-59,0295	4,0664	-100,6415	-3,7081	-0,1273
18	-6,6811	-6,6811	-6,6811	-42,3078	-22,4256	-64,7334	13,3688	-95,2874	-3,6835	-0,1237
19	-6,6183	-6,6183	-6,6183	-36,4807	-21,3204	-57,8011	0,0000	-94,5778	-2,8286	-0,1226
20	-6,3774	-6,3774	-6,3774	-42,7513	-24,1397	-66,8910	7,2872	-113,3757	-4,2140	-0,1181
21	-6,2698	-6,2698	-6,2698	-36,3545	-17,1883	-53,5428	5,9603	-88,3687	-3,6721	-0,1161
22	-6,2481	-6,2481	-6,2481	-37,9546	-19,0401	-56,9947	0,0000	-85,0044	-2,9364	-0,1157
23	-6,1711	-6,1711	-6,1711	-34,9723	-24,4746	-59,4469	6,5160	-72,8986	-2,1734	-0,1143
24	-6,0778	-6,0778	-6,0778	-41,1487	-25,8082	-66,9568	0,0000	-114,3497	-3,7186	-0,1126
25	-5,6995	-5,6995	-5,6995	-41,2160	-20,8644	-62,0804	4,7289	-91,0587	-2,9139	-0,1055
26	-5,3995	-5,3995	-5,3995	-40,4007	-15,3808	-55,7815	4,2051	-88,3320	-2,5073	-0,1000
27	-5,3972	-5,3972	-5,3972	-44,6809	-22,0417	-66,7225	5,0582	-100,0126	-3,0836	-0,0999
28	-5,1385	-5,1385	-5,1385	-40,6953	-18,0420	-58,7374	8,3795	-86,2500	-2,6648	-0,0952
29	-4,9049	-4,9049	-4,9049	-38,2345	-15,7761	-54,0106	4,7503	-86,6629	-2,6842	-0,0908
30	-3,1266	-3,1266	-3,1266	-46,7890	-12,2134	-59,0024	6,2600	-85,2767	-2,8042	-0,0579
31	-4,1139	-4,1139	-4,1139	-40,8475	-16,1672	-57,0146	0,0000	-91,0125	-2,8739	-0,0762

32 | -3,6076 | -3,6076 | -3,6076 | -41,7365 | -18,5347 | -60,2712 | 11,6462 | -82,2539 | -1,9606 | -0,0668

Tab. 41: Docking-Ergebnis für Ligand **55-Int** in der *open gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-5,1823	-5,1823	-5,1823	-37,4232	-17,1122	-54,5354	7,5786	-76,0952	-2,5200	-0,0909
2	-4,9565	-4,9565	-4,9565	-43,2018	-18,5322	-61,7339	10,4746	-84,6124	-2,5500	-0,0870
3	-4,8489	-4,8489	-4,8489	-39,8685	-19,6617	-59,5302	11,3399	-86,5848	-1,9767	-0,0851
4	-4,6626	-4,6626	-4,6626	-34,3163	-18,4903	-52,8066	15,5512	-72,1080	-1,5057	-0,0818
5	-4,6032	-4,6032	-4,6032	-45,6176	-15,0667	-60,6843	7,7429	-89,8890	-2,5313	-0,0808
6	-4,5626	-4,5626	-4,5626	-39,6278	-14,7488	-54,3766	5,3500	-93,1665	-1,2750	-0,0800
7	-4,5066	-4,5066	-4,5066	-39,5404	-13,5841	-53,1245	8,8292	-78,7503	-2,5015	-0,0791
8	-4,4218	-4,4218	-4,4218	-43,2499	-13,8082	-57,0581	10,5476	-79,0012	-1,8017	-0,0776
9	-4,4123	-4,4123	-4,4123	-40,0590	-14,7769	-54,8359	5,3943	-69,1872	-1,5900	-0,0774
10	-4,3965	-4,3965	-4,3965	-43,5277	-16,1917	-59,7193	8,8206	-82,8266	-1,8465	-0,0771
11	-4,3455	-4,3455	-4,3455	-47,8299	-12,4923	-60,3221	8,8424	-77,9601	-0,4800	-0,0762
12	-4,1272	-4,1272	-4,1272	-36,7834	-17,2630	-54,0464	11,0507	-79,1182	-1,1170	-0,0724
13	-4,1168	-4,1168	-4,1168	-46,1971	-18,1295	-64,3266	9,3649	-94,1985	-2,3263	-0,0722
14	-4,1130	-4,1130	-4,1130	-48,6230	-19,2276	-67,8506	10,5553	-88,8808	-1,0865	-0,0722
15	-4,0471	-4,0471	-4,0471	-46,2671	-13,0326	-59,2997	10,6347	-86,9161	-2,0769	-0,0710
16	-4,0435	-4,0435	-4,0435	-39,4599	-14,6678	-54,1277	7,1287	-78,9874	-1,4400	-0,0709
17	-4,0026	-4,0026	-4,0026	-46,0914	-6,1887	-52,2801	7,8550	-81,8782	-1,5196	-0,0702
18	-3,8959	-3,8959	-3,8959	-45,2965	-16,6735	-61,9700	9,5857	-91,5011	-1,8782	-0,0683
19	-3,8561	-3,8561	-3,8561	-43,5963	-13,1341	-56,7304	8,9763	-83,1847	-1,8612	-0,0677
20	-3,8279	-3,8279	-3,8279	-44,4628	-18,0365	-62,4993	12,1897	-88,9270	-1,7047	-0,0672
21	-3,7902	-3,7902	-3,7902	-39,9338	-15,0466	-54,9805	6,9323	-82,6888	-1,1665	-0,0665
22	-3,7752	-3,7752	-3,7752	-41,3686	-11,0259	-52,3945	10,2676	-81,0791	-2,2553	-0,0662
23	-3,6470	-3,6470	-3,6470	-41,7277	-17,1480	-58,8757	9,3119	-76,7279	-1,0337	-0,0640
24	-3,5973	-3,5973	-3,5973	-43,1636	-11,7783	-54,9420	9,8619	-80,2446	-2,0700	-0,0631
25	-3,5384	-3,5384	-3,5384	-44,6312	-10,0115	-54,6427	6,9144	-78,7865	-1,4400	-0,0621
26	-3,5353	-3,5353	-3,5353	-40,9978	-15,5591	-56,5569	11,3163	-86,1350	-1,6250	-0,0620
27	-3,4937	-3,4937	-3,4937	-38,9532	-12,7646	-51,7178	10,6653	-82,0179	-0,9600	-0,0613
28	-3,3404	-3,3404	-3,3404	-41,2547	-16,9733	-58,2280	9,5317	-77,9877	-1,5987	-0,0586
29	-3,2452	-3,2452	-3,2452	-39,3018	-17,4284	-56,7302	6,1422	-78,0584	-1,5900	-0,0569
30	-3,0813	-3,0813	-3,0813	-37,4693	-17,0071	-54,4764	5,4441	-82,6628	-1,4400	-0,0541
31	-0,1229	-0,1229	-0,1229	-49,0886	-15,8110	-64,8996	10,7223	-84,0262	-2,6821	-0,0022

Tab. 42: Docking-Ergebnis für Ligand **55-Int** in der *closed gate*-Kristallstruktur von FimH.

	docking score	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	glide einternal	glide emodel	XP HBond	glide ligand efficiency
1	-8,8634	-8,8634	-8,8634	-33,0096	-33,1342	-66,1438	7,1134	-126,5806	-5,0872	-0,1555
2	-8,7354	-8,7354	-8,7354	-43,5828	-31,3264	-74,9093	6,3694	-142,2995	-5,6212	-0,1533
3	-8,3740	-8,3740	-8,3740	-34,2881	-27,8314	-62,1195	14,6922	-110,0351	-4,5481	-0,1469
4	-8,0988	-8,0988	-8,0988	-41,4567	-30,5910	-72,0477	5,3134	-135,0663	-4,6300	-0,1421
5	-8,0951	-8,0951	-8,0951	-27,5052	-29,2251	-56,7303	7,7004	-105,1578	-4,4330	-0,1420
6	-8,0521	-8,0521	-8,0521	-41,4973	-27,7390	-69,2363	5,7991	-101,4258	-4,5223	-0,1413
7	-8,0225	-8,0225	-8,0225	-40,2996	-31,1699	-71,4695	14,8228	-110,0409	-5,2395	-0,1407
8	-7,9835	-7,9835	-7,9835	-27,8879	-33,4295	-61,3174	7,0161	-97,3158	-3,2128	-0,1401
9	-7,8329	-7,8329	-7,8329	-33,8245	-30,0658	-63,8903	14,8573	-110,7726	-5,5806	-0,1374
10	-7,8154	-7,8154	-7,8154	-40,6798	-32,4886	-73,1683	0,0000	-114,6841	-3,7647	-0,1371
11	-7,7368	-7,7368	-7,7368	-33,0417	-35,0573	-68,0990	9,0829	-107,7533	-4,2235	-0,1357
12	-7,6086	-7,6086	-7,6086	-36,1313	-25,6773	-61,8085	6,0030	-112,6968	-3,9670	-0,1335
13	-7,5888	-7,5888	-7,5888	-42,1728	-25,8856	-68,0584	7,6364	-115,5807	-3,9980	-0,1331
14	-7,5858	-7,5858	-7,5858	-41,4142	-29,0543	-70,4684	0,0000	-112,9955	-4,0523	-0,1331
15	-7,5302	-7,5302	-7,5302	-42,4103	-21,3751	-63,7854	5,1369	-91,8750	-3,1374	-0,1321
16	-7,4758	-7,4758	-7,4758	-41,0455	-27,6564	-68,7019	4,2791	-107,6446	-3,6544	-0,1312
17	-7,2097	-7,2097	-7,2097	-45,0251	-24,7921	-69,8172	4,1942	-114,9468	-3,7674	-0,1265
18	-7,1552	-7,1552	-7,1552	-37,8211	-32,6964	-70,5176	8,6364	-108,1368	-3,6320	-0,1255
19	-7,1314	-7,1314	-7,1314	-32,1770	-29,4156	-61,5926	6,5998	-97,3552	-4,3297	-0,1251
20	-7,1301	-7,1301	-7,1301	-37,4167	-28,1424	-65,5591	8,0174	-116,9776	-4,4534	-0,1251
21	-6,8944	-6,8944	-6,8944	-34,7238	-29,1622	-63,8860	7,7667	-96,0210	-3,3486	-0,1210
22	-6,5064	-6,5064	-6,5064	-35,3352	-23,4479	-58,7831	6,7489	-103,9740	-3,7307	-0,1141
23	-6,4320	-6,4320	-6,4320	-41,5663	-27,7036	-69,2699	4,2745	-123,4062	-3,2274	-0,1128
24	-6,4205	-6,4205	-6,4205	-51,7748	-17,9756	-69,7503	5,4587	-119,0353	-3,1438	-0,1126
25	-6,2940	-6,2940	-6,2940	-40,0767	-24,8068	-64,8835	10,0329	-109,8263	-3,9827	-0,1104
26	-5,9338	-5,9338	-5,9338	-36,9664	-19,1982	-56,1646	11,4704	-87,1783	-3,1394	-0,1041
27	-5,7593	-5,7593	-5,7593	-36,5177	-20,8659	-57,3836	5,7710	-95,3334	-2,6027	-0,1010
28	-5,2470	-5,2470	-5,2470	-42,9861	-18,9510	-61,9372	7,2943	-108,6778	-3,4148	-0,0921
29	-4,6922	-4,6922	-4,6922	-31,2070	-22,2171	-53,4241	11,8163	-91,4641	-2,2539	-0,0823
30	-4,1995	-4,1995	-4,1995	-37,5735	-19,3862	-56,9597	6,9961	-86,5438	-2,3033	-0,0737
31	-3,9746	-3,9746	-3,9746	-39,6951	-15,3618	-55,0569	6,3372	-80,9580	-1,6555	-0,0697
32	-3,9128	-3,9128	-3,9128	-40,2562	-14,2432	-54,4994	0,0000	-83,8573	-1,3852	-0,0686

6.2.3 Ligand-Interaktionsdiagramme

Die folgenden Ligand-Interaktionsdiagramme zeigen die verschiedenen Wechselwirkungstypen, welche der Ligand in der Bindungstasche mit dem Protein eingeht. Es sind jeweils alle Interaktionen des Liganden in der Konformation mit dem niedrigsten Docking-Score zum Protein im Umkreis von 5 Å dargestellt. Die folgende Legende gilt für alle gezeigten Abbildungen:

- | | | |
|--|---|---|
| ● Charged (negative) | ● Hydrophobic | → H-bond (backbone) |
| ● Charged (positive) | ● Glycine | - - H-bond (side chain) |
| ● Polar | — π-π stacking | |

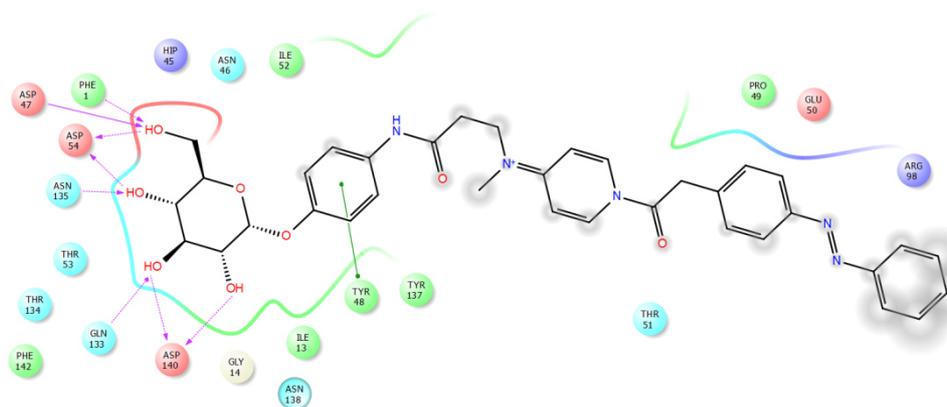


Abb. 122: Ligand-Interaktionsdiagramm von *52-Int* in der *open gate*-Kristallstruktur.

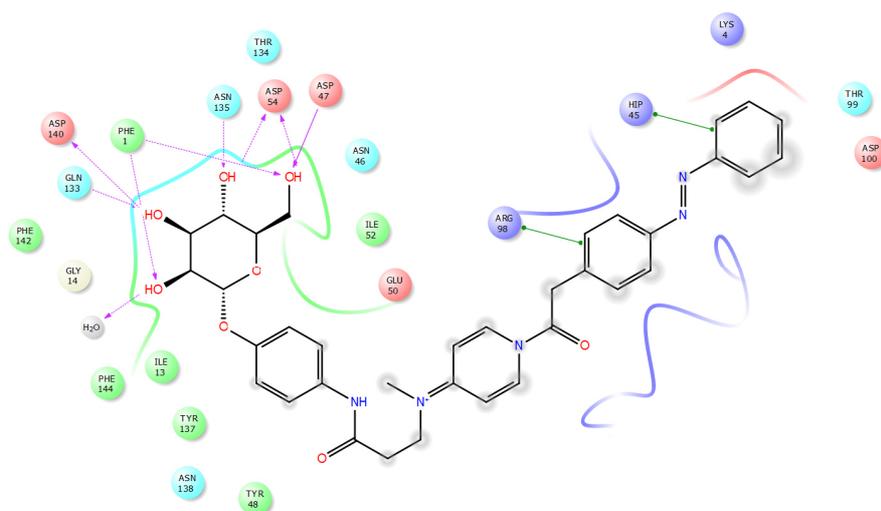


Abb. 123: Ligand-Interaktionsdiagramm von *52-Int* in der *closed gate*-Kristallstruktur.

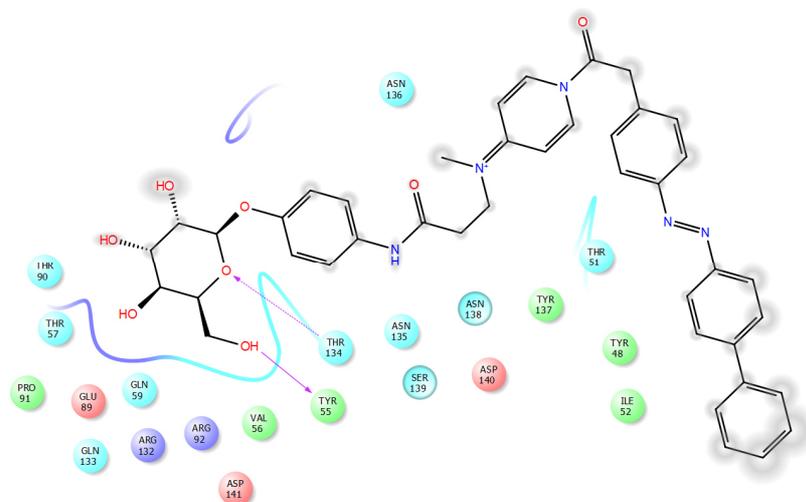


Abb. 124: Ligand-Interaktionsdiagramm von **54-Int** in der *open gate*-Kristallstruktur.

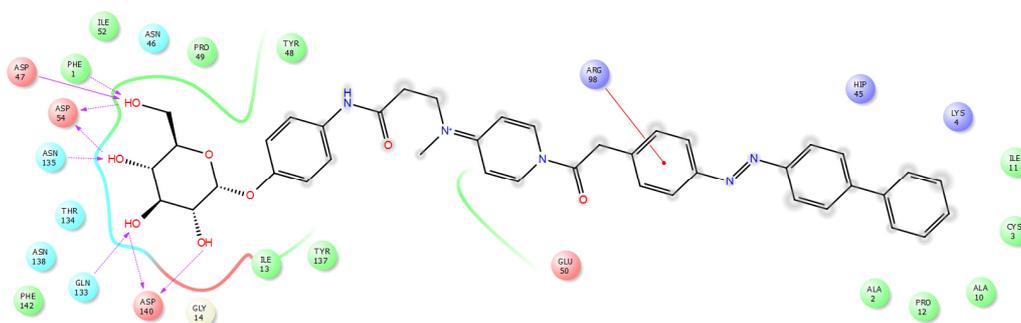


Abb. 125: Ligand-Interaktionsdiagramm von **54-Int** in der *closed gate*-Kristallstruktur.

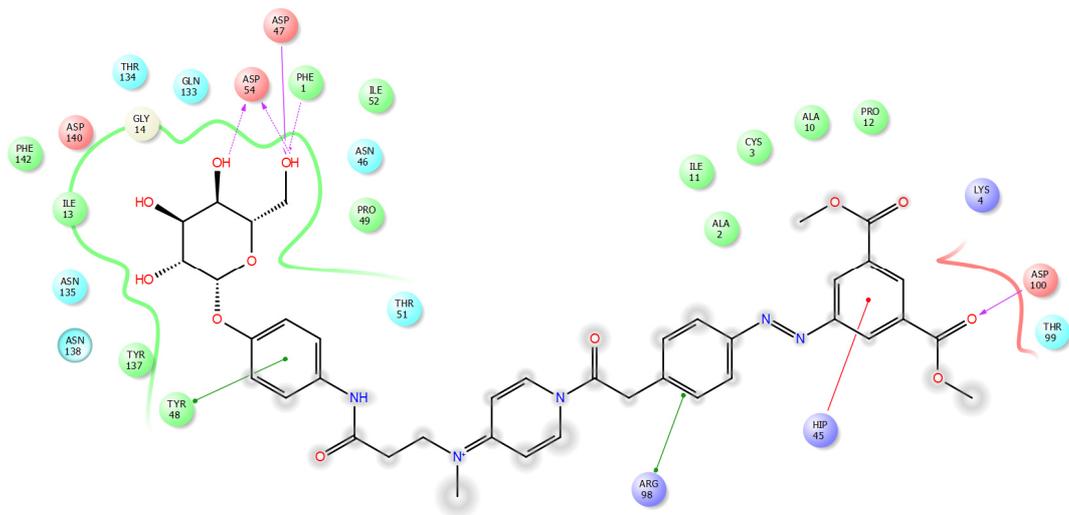


Abb. 126: Ligand-Interaktionsdiagramm von *53-Int* in der *open gate*-Kristallstruktur.

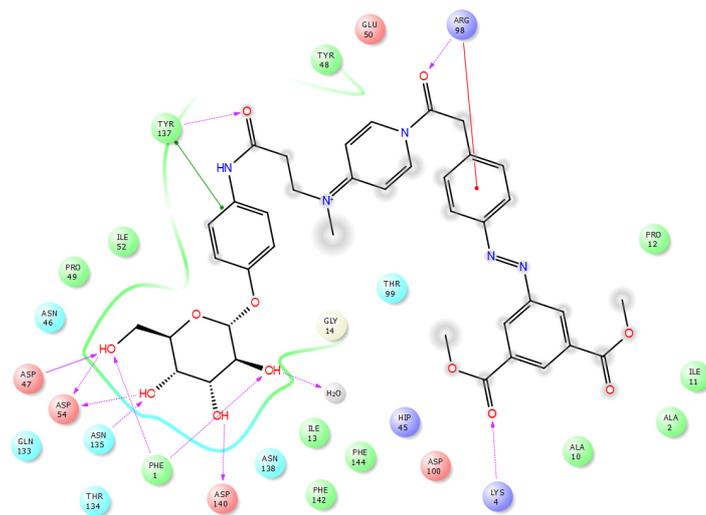


Abb. 127: Ligand-Interaktionsdiagramm von *53-Int* in der *closed gate*-Kristallstruktur.

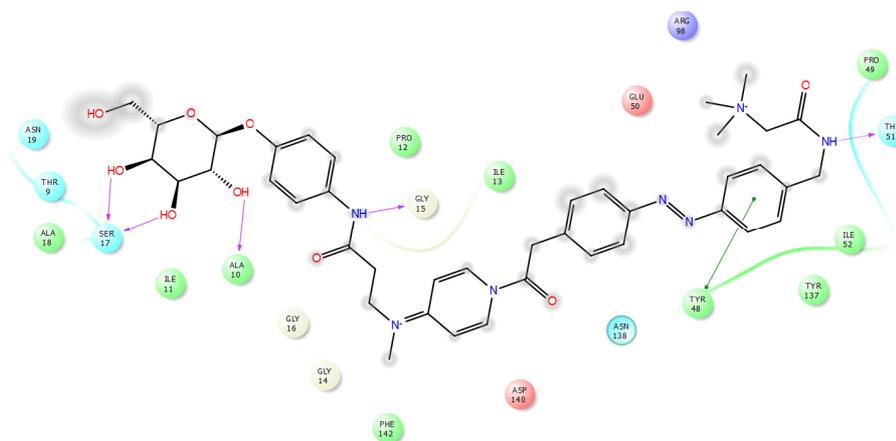


Abb. 128: Ligand-Interaktionsdiagramm von **55-Int** in der *open gate*-Kristallstruktur.

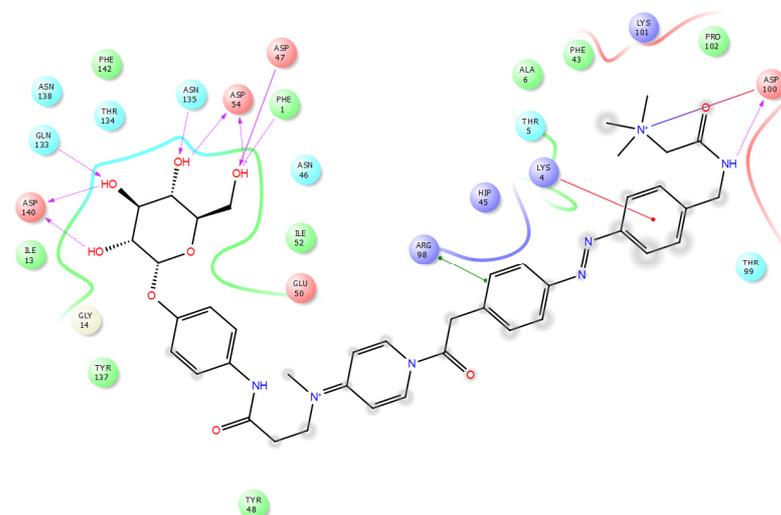


Abb. 129: Ligand-Interaktionsdiagramm von **55-Int** in der *closed gate*-Kristallstruktur.

6.2.4 Ergebnisse der Diederwinkelskans

Nach dem Docking der Azobenzolderivate **52-Int-55-Int** wurde die kovalente Bindungsbildung der Verbindungen zu TYR48, TYR137 und THR51 manuell vollzogen. Die folgenden Tabellen zeigen die potentiellen Energien der gebundenen Azobenzolstrukturen bei der Rotation um zwei Diederwinkel (Kapitel 3.3.4).

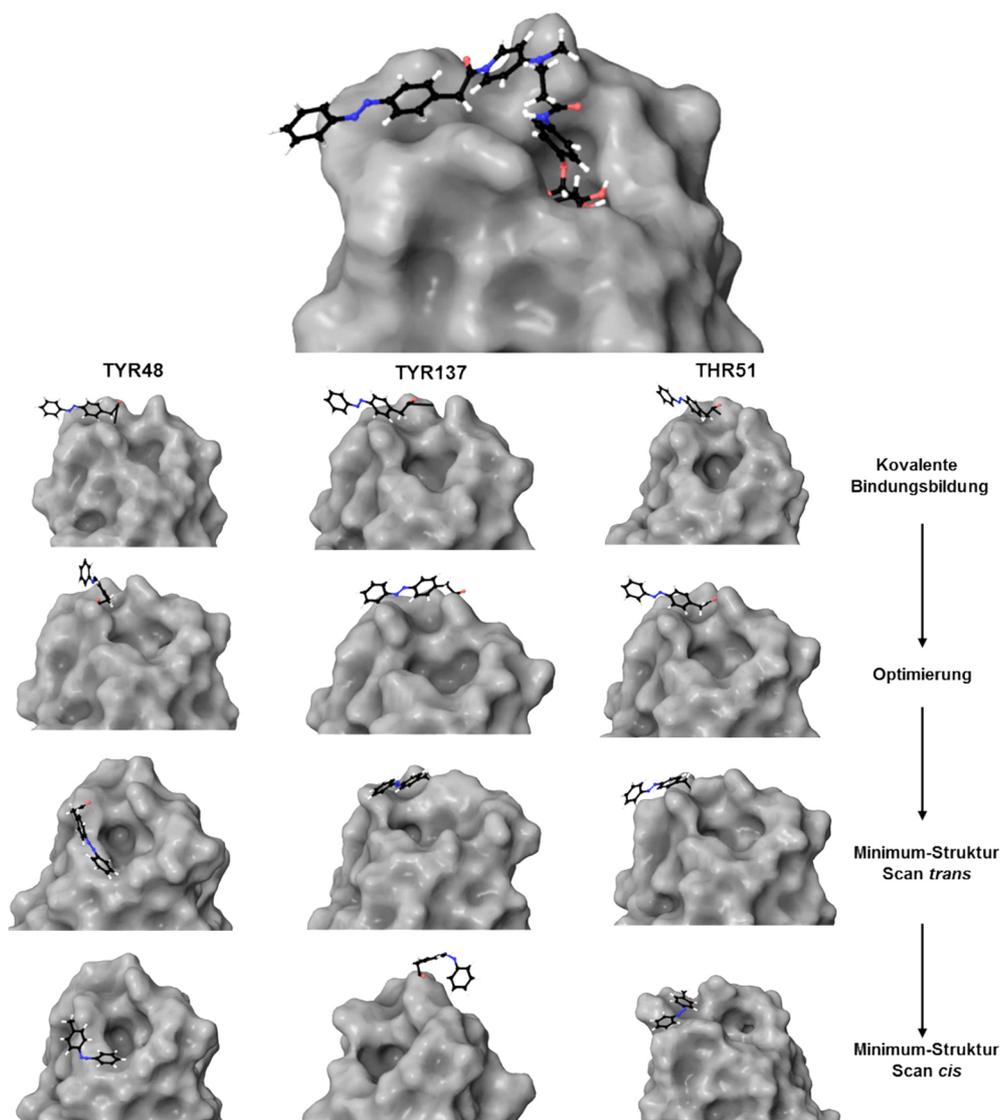


Abb. 130: Übersicht des Prozesses der kovalenten Bindungsbildung und Darstellung der Minimumstrukturen für die Bindung von **52** an TYR48, TYR137 und THR51 in der *open gate*-Struktur.

Tab. 43: **52** *open gate*-Struktur. Berechnete Energien nach Verstellung der Diederwinkel 1 und 2 in 30°-Schritten für die Bindung des Azobenzols an TYR48, TYR137 und THR51 in *trans*- und *cis*-Konfiguration.

DW1	DW2	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>
		TYR48	TYR137	THR51	TYR48	TYR137	THR51
0	0	-48541,2	-48569,0	-48579,4	-48501,6	-40968,4	-48539,8
30	0	-48605,4	-48579,6	-48539,0	-48539,4	-48505,3	-48553,2
60	0	-48501,3	-48603,2	-48553,1	-48563,3	-48525,2	-48569,3
90	0	-48394,3	-48602,1	-48587,0	-48561,6	-48577,7	-48568,2
120	0	-48313,4	-48590,7	-48582,3	-48551,3	-48567,2	-48549,9
150	0	-48269,5	-48596,8	-48568,0	-48553,7	-48561,6	-48557,7

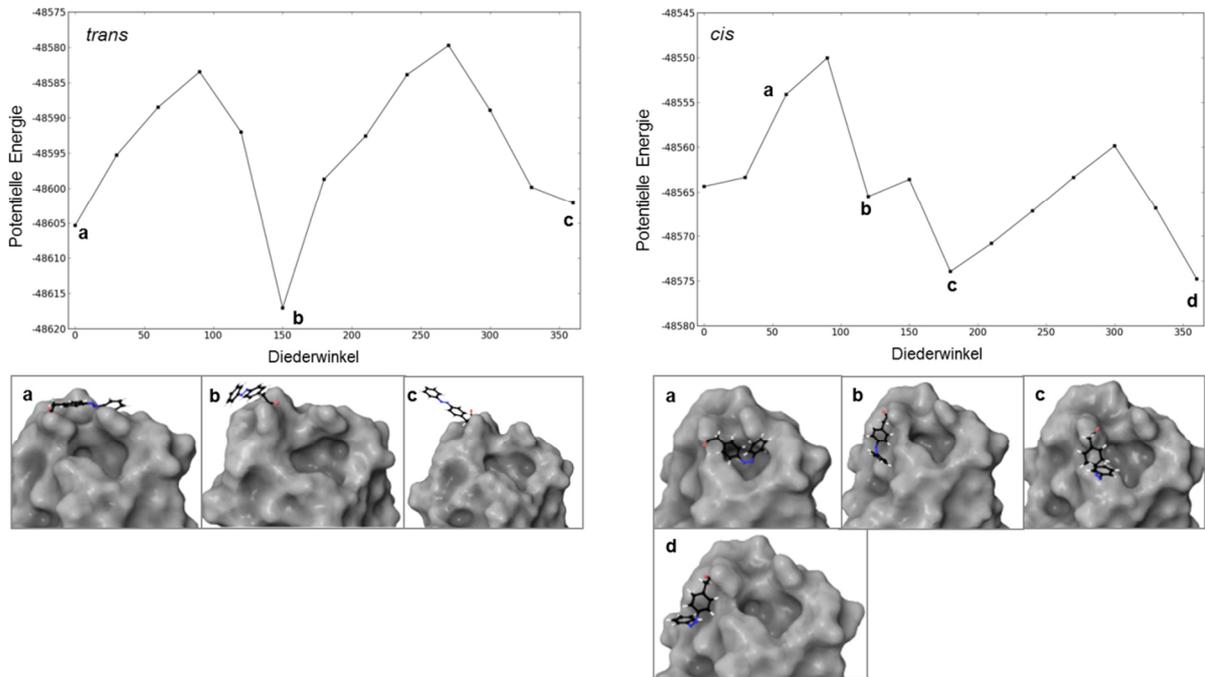
180	0	-48256,4	-48598,5	-48544,1	-48556,7	-48561,7	-48559,4
210	0	-48269,4	-48597,0	-48565,4	-48552,9	-48555,1	-48554,1
240	0	-48313,1	-48610,1	-48536,5	-48546,7	-48560,0	-48560,7
270	0	-48392,6	-48618,1	-48503,5	-48558,6	-48574,2	-48548,3
300	0	-48505,2	-48603,0	-48509,1	-48564,4	-48566,2	-48553,0
330	0	-48604,5	-48586,3	-48521,2	-48548,1	-48537,6	-48529,7
360	0	-48576,3	-41527,6	-48524,6	-48533,1	-48512,8	-48516,3
0	30	-48586,1	-48559,7	-48523,2	-48533,9	-48517,0	-48543,4
30	30	-48595,3	-48580,8	-48531,9	-48553,8	-48548,2	-48552,6
60	30	-48508,4	-48600,4	-48527,6	-48561,0	-48566,1	-48565,5
90	30	-48401,9	-48592,6	-48542,2	-48552,9	-48562,2	-48554,3
120	30	-48311,8	-48630,1	-48547,8	-48549,4	-48557,6	-48550,5
150	30	-48252,6	-48640,1	-48543,8	-48551,4	-48558,3	-48552,6
180	30	-48223,6	-48643,8	-48546,8	-48553,2	-48561,9	-48552,8
210	30	-48282,4	-48649,0	-41092,9	-48548,4	-48560,6	-48550,6
240	30	-48333,0	-48660,9	-48569,8	-48553,2	-48561,6	-48549,5
270	30	-48420,0	-48665,2	-48584,0	-48563,4	-48571,1	-48558,6
300	30	-48519,2	-48656,0	-48547,6	-48559,4	-48553,7	-48534,9
330	30	-48585,4	-48636,4	-48558,3	-48539,4	-48522,4	-48556,7
360	30	-48581,5	-37033,7	-48559,8	-48535,7	-48503,6	-48594,9
0	60	-48578,3	-48626,6	-48548,2	-48542,7	-48535,8	-48602,5
30	60	-48588,5	-48635,6	-48548,1	-48543,9	-48545,8	-48608,7
60	60	-48521,2	-48637,3	-48543,9	-48542,1	-48557,2	-48596,7
90	60	-48417,0	-48629,7	-48557,0	-48541,1	-48553,9	-48592,2
120	60	-48324,8	-48628,2	-48589,1	-48537,3	-48539,4	-48590,2
150	60	-48268,9	-48634,3	-48589,1	-48537,9	-48538,7	-48596,9
180	60	-48257,0	-48638,6	-48585,4	-48540,1	-48540,6	-48601,5
210	60	-48272,8	-48639,6	-48579,6	-48550,7	-48544,8	-48602,5
240	60	-48321,3	-48628,2	-48589,0	-48554,1	-48563,0	-48598,8
270	60	-48406,4	-48609,7	-48594,3	-48543,0	-48559,3	-48610,2
300	60	-48510,1	-48652,6	-48587,3	-48528,5	-48542,3	-48599,4
330	60	-48575,8	-48645,1	-48576,4	-48522,8	-48528,0	-48587,8
360	60	-48578,8	-48642,1	-48565,0	-48534,0	-48534,8	-48591,2
0	90	-48571,7	-48636,8	-48550,6	-48529,2	-48544,7	-48580,7
30	90	-48583,5	-48637,1	-48549,5	-48531,8	-48550,8	-48580,5
60	90	-48520,3	-48648,2	-48545,5	-48534,2	-48548,8	-48589,3
90	90	-48417,3	-48640,2	-48568,1	-48531,6	-48537,9	-48587,1
120	90	-48327,1	-48628,4	-48570,8	-48528,5	-48529,9	-48585,0
150	90	-48273,2	-48628,7	-48564,6	-48539,0	-48533,2	-48586,9
180	90	-48255,3	-48629,7	-48581,0	-48550,0	-48535,6	-48587,2
210	90	-48271,5	-48629,5	-48578,9	-48549,5	-48532,1	-48590,5
240	90	-48323,4	-48635,5	-48582,4	-48547,4	-48540,8	-48596,7
270	90	-48409,7	-48648,7	-48566,7	-48541,7	-48552,7	-48601,0
300	90	-48507,6	-48654,5	-48576,0	-48540,8	-48540,9	-48612,6

330	90	-48568,9	-48645,3	-48575,4	-48531,2	-48517,9	-48607,0
360	90	-48571,3	-48634,8	-48575,4	-48532,4	-48544,3	-48591,0
0	120	-48579,0	-48653,9	-48579,9	-48538,9	-48549,0	-48594,1
30	120	-48592,0	-48667,8	-48573,1	-48541,7	-48540,1	-48635,5
60	120	-48530,5	-48679,8	-48574,1	-48545,3	-48534,5	-48630,0
90	120	-48419,2	-48673,3	-48575,7	-48544,4	-48533,4	-48622,4
120	120	-48334,3	-48649,2	-48570,9	-48542,1	-48530,6	-48610,3
150	120	-48284,4	-48646,4	-48557,6	-48544,0	-48530,9	-48627,1
180	120	-48269,0	-48647,3	-48583,4	-48556,3	-48531,8	-48626,1
210	120	-48282,3	-48646,8	-48586,1	-48555,7	-48530,9	-48622,8
240	120	-48330,2	-48648,0	-48575,3	-48547,8	-48552,1	-48622,3
270	120	-48414,8	-48653,3	-48577,3	-48565,5	-48558,4	-48625,8
300	120	-48519,8	-48657,3	-48578,5	-48555,7	-48557,8	-48639,5
330	120	-48580,9	-48656,6	-48576,4	-48565,4	-48536,8	-48642,1
360	120	-48583,5	-48664,1	-48572,7	-48546,9	-48569,4	-48639,1
0	150	-48595,1	-48691,6	-48586,9	-48558,9	-48568,2	-48659,0
30	150	-48617,1	-48700,8	-48590,2	-48561,4	-48568,2	-48656,2
60	150	-48542,2	-48703,8	-48594,3	-48563,6	-48564,2	-48651,8
90	150	-48437,2	-48693,4	-48598,2	-48559,5	-48548,0	-48642,6
120	150	-48351,2	-48680,1	-48595,3	-48555,1	-48545,0	-48645,8
150	150	-48300,5	-48671,3	-48594,8	-48555,2	-48545,4	-48649,7
180	150	-48285,6	-48671,7	-48599,4	-48556,5	-48546,3	-48651,3
210	150	-48301,9	-48670,5	-48591,4	-48555,4	-48545,3	-48647,4
240	150	-48351,0	-48670,9	-48582,1	-48555,6	-48545,7	-48648,0
270	150	-48436,9	-48675,0	-48596,3	-48558,9	-48576,6	-48652,3
300	150	-48533,0	-48681,6	-48593,4	-48560,3	-48578,5	-48669,7
330	150	-48592,5	-48692,1	-48590,6	-48556,9	-48555,4	-48666,0
360	150	-48594,5	-48691,7	-48589,0	-48559,5	-48554,5	-48659,1
0	180	-48598,7	-48706,3	-48593,2	-48566,4	-48561,2	-48664,7
30	180	-48597,1	-48704,7	-48594,3	-48569,1	-48564,8	-48660,7
60	180	-48537,5	-48709,4	-48594,2	-48574,0	-48575,4	-48654,1
90	180	-48439,1	-48708,9	-48590,6	-48571,1	-48561,3	-48646,9
120	180	-48352,5	-48698,5	-48601,2	-48567,6	-48553,0	-48644,6
150	180	-48303,3	-48685,9	-48595,4	-48565,2	-48552,0	-48651,0
180	180	-48289,2	-48682,9	-48588,7	-48563,7	-48553,3	-48658,0
210	180	-48303,8	-48681,5	-48585,8	-48561,6	-48552,6	-48657,0
240	180	-48353,4	-48681,5	-48597,2	-48561,5	-48552,5	-48654,8
270	180	-48440,0	-48686,1	-48597,8	-48564,9	-48555,9	-48667,1
300	180	-48537,8	-48706,2	-48598,5	-48566,4	-48574,3	-48675,4
330	180	-48597,3	-48705,7	-48602,2	-48563,2	-48571,8	-48672,1
360	180	-48598,6	-48700,7	-48598,2	-48561,8	-48561,2	-48664,6
0	210	-48592,1	-48683,1	-48594,3	-48568,6	-48555,8	-48643,8
30	210	-48590,5	-48674,5	-48592,1	-48569,7	-48568,4	-48634,6

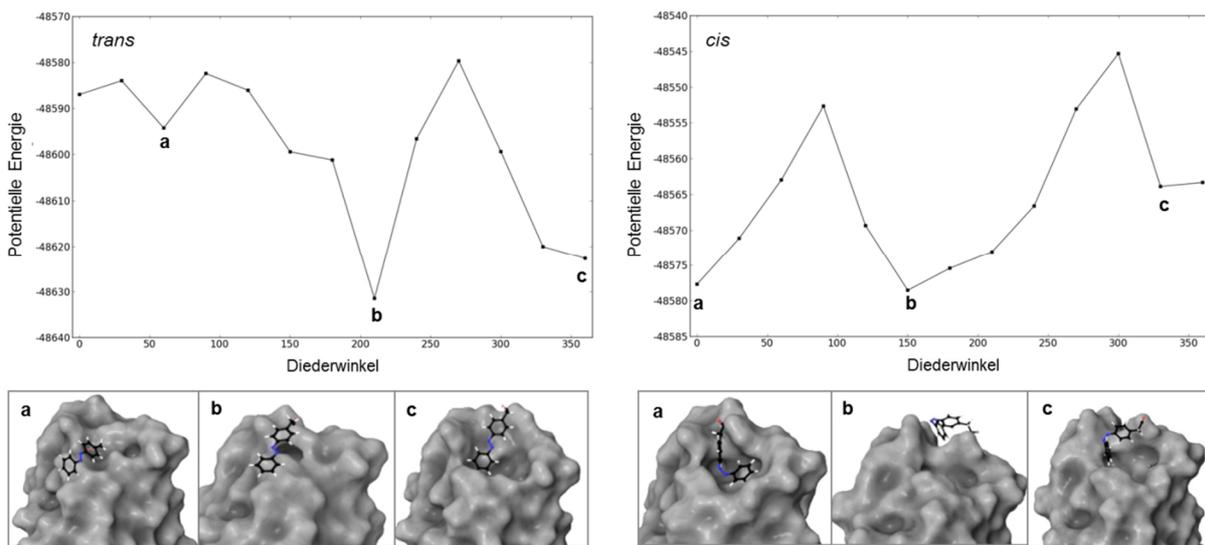
60	210	-48530,6	-48686,1	-48601,3	-48570,8	-48573,1	-48624,1
90	210	-48432,5	-48682,3	-48604,2	-48567,2	-48571,3	-48622,6
120	210	-48345,8	-48674,6	-48607,8	-48565,0	-48554,9	-48625,3
150	210	-48295,1	-48671,6	-40682,5	-48563,2	-48547,6	-48631,0
180	210	-48280,9	-48671,5	-48582,9	-48563,1	-48547,4	-48642,4
210	210	-48295,8	-48670,3	-48631,5	-48558,8	-48546,7	-48641,7
240	210	-48345,5	-48670,5	-48599,2	-48557,4	-48546,5	-48642,0
270	210	-48432,0	-48674,9	-48589,0	-48560,4	-48549,4	-48653,3
300	210	-48530,4	-48693,4	-48588,3	-48561,7	-48550,0	-48652,1
330	210	-48590,4	-48694,1	-48586,0	-48559,7	-48555,5	-48655,2
360	210	-48592,6	-48683,2	-48580,6	-48568,4	-48555,7	-48643,7
0	240	-48577,0	-48637,9	-48571,9	-48561,9	-48548,8	-48553,7
30	240	-48575,2	-48636,3	-48583,2	-48564,5	-48557,9	-48536,0
60	240	-48514,6	-48641,1	-48586,5	-48567,2	-48566,6	-48521,0
90	240	-48416,4	-48636,3	-48581,4	-48554,3	-48564,0	-48614,5
120	240	-48331,0	-48644,9	-48596,6	-48550,6	-48552,1	-48613,6
150	240	-48282,0	-48651,8	-48566,2	-48545,7	-48539,0	-48612,7
180	240	-48267,8	-48646,5	-48565,1	-48545,3	-48531,1	-48610,4
210	240	-48284,1	-48657,9	-48564,9	-48545,8	-48530,5	-48602,9
240	240	-48333,8	-48645,6	-48568,4	-48543,0	-48530,3	-48608,9
270	240	-48420,6	-48635,8	-48565,7	-48545,6	-48533,2	-48616,6
300	240	-48516,7	-48636,2	-48562,4	-48546,8	-48534,4	-48616,2
330	240	-48583,9	-48633,9	-48561,0	-48559,3	-48549,9	-48612,9
360	240	-48581,8	-48632,4	-48558,4	-48561,6	-48552,6	-48606,9
0	270	-48577,8	-48621,9	-48555,7	-48545,7	-48553,1	-48577,7
30	270	-48575,6	-48633,2	-48559,9	-48551,6	-48549,7	-48612,0
60	270	-48511,5	-48640,5	-48554,3	-48559,5	-48544,1	-48621,7
90	270	-48415,6	-48641,3	-48571,5	-48563,4	-48522,9	-48622,0
120	270	-48329,6	-48631,3	-48557,1	-48555,7	-48546,3	-48614,0
150	270	-48281,0	-48631,9	-48551,1	-48549,2	-48540,5	-48603,1
180	270	-48265,8	-48630,7	-48572,1	-48535,0	-48533,1	-48597,0
210	270	-48279,0	-48630,4	-48562,6	-48535,9	-48518,9	-48586,7
240	270	-48327,5	-48628,8	-48577,6	-48535,5	-48520,1	-48581,3
270	270	-48414,5	-48634,2	-48556,0	-48537,2	-48523,5	-48581,4
300	270	-48510,8	-48649,4	-48569,8	-48540,9	-48535,5	-48578,7
330	270	-48579,7	-48656,3	-48568,1	-48547,8	-48546,0	-48586,7
360	270	-48572,6	-48647,4	-48579,7	-48544,1	-48553,0	-48600,8
0	300	-48588,7	-48614,2	-48594,3	-48541,1	-48546,7	-48613,7
30	300	-48585,8	-48625,4	-48598,1	-48535,4	-48525,7	-48610,1
60	300	-48521,9	-48637,4	-48594,3	-48545,9	-48520,6	-48621,0
90	300	-48418,8	-48642,5	-48599,4	-48559,3	-48545,3	-48626,5
120	300	-48328,2	-48637,3	-48587,8	-48554,3	-48547,5	-48619,4
150	300	-48274,3	-48634,2	-48576,8	-48558,0	-48527,0	-48611,1
180	300	-48255,6	-48634,3	-48581,8	-48553,9	-48533,1	-48605,5

210	300	-48265,3	-48633,2	-48593,8	-48546,8	-48531,4	-48602,0
240	300	-48314,3	-48632,4	-48592,7	-48545,7	-48531,6	-48598,7
270	300	-48404,4	-48635,8	-48580,9	-48551,5	-48532,8	-48604,0
300	300	-48504,3	-48653,5	-48569,1	-48559,8	-48536,2	-48606,9
330	300	-48580,5	-48651,8	-48571,8	-48553,4	-48545,0	-48614,6
360	300	-48588,9	-48635,6	-48569,9	-48536,3	-48536,5	-48613,8
0	330	-48597,9	-48615,6	-48573,8	-48518,4	-48536,1	-48607,8
30	330	-48599,9	-48641,8	-48571,4	-48524,2	-48534,2	-48610,3
60	330	-48518,5	-48672,5	-48575,3	-48551,4	-48553,0	-48625,5
90	330	-48410,5	-48670,5	-48588,1	-48562,9	-48555,0	-48633,7
120	330	-48319,1	-48659,6	-48589,8	-48565,7	-48547,7	-48625,4
150	330	-48267,7	-48656,1	-48567,1	-48563,5	-48545,6	-48614,8
180	330	-48250,3	-48659,5	-48564,2	-48565,5	-48560,1	-48621,4
210	330	-48260,7	-48658,9	-48608,0	-48557,4	-48556,0	-48620,2
240	330	-48303,9	-48656,3	-48616,0	-48558,2	-48556,1	-48618,0
270	330	-48394,3	-48657,8	-48620,1	-48566,9	-48559,7	-48631,4
300	330	-48510,4	-48661,3	-48617,1	-48564,4	-48563,9	-48634,4
330	330	-48590,3	-48648,3	-48614,3	-48546,6	-48550,7	-48630,8
360	330	-48597,5	-48606,2	-48604,5	-48517,6	-48530,6	-48608,0
0	360	-48602,1	-48642,7	-48622,7	-48514,4	-48526,7	-48597,3
30	360	-48599,7	-48663,6	-48616,0	-48537,4	-48541,1	-48606,8
60	360	-48513,3	-48678,1	-48609,6	-48562,5	-48557,0	-48631,4
90	360	-48397,9	-48669,9	-48620,6	-48560,0	-48554,7	-48632,2
120	360	-48309,4	-48660,4	-48613,9	-48575,1	-48548,6	-48617,7
150	360	-48262,0	-48661,0	-48593,5	-48574,8	-48561,3	-48624,7
180	360	-48247,9	-48666,0	-48579,7	-48572,1	-48561,6	-48624,4
210	360	-48261,7	-48663,3	-48589,4	-48565,9	-48561,7	-48626,2
240	360	-48309,1	-48658,4	-48605,1	-48564,2	-48557,4	-48635,7
270	360	-48397,6	-48658,9	-48608,9	-48565,0	-48563,3	-48644,2
300	360	-48510,7	-48653,8	-48609,3	-48556,8	-48560,2	-48626,5
330	360	-48595,9	-48651,1	-48611,8	-48521,7	-48538,3	-48615,7
360	360	-48601,8	-48642,3	-48608,4	-48501,3	-48521,6	-48607,7

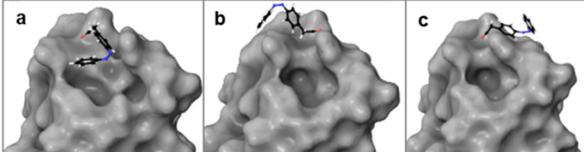
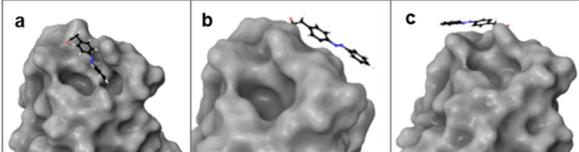
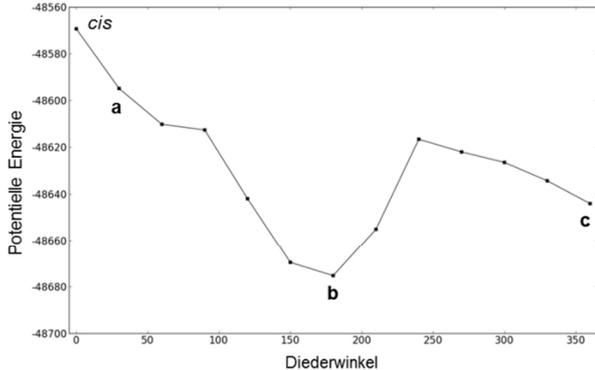
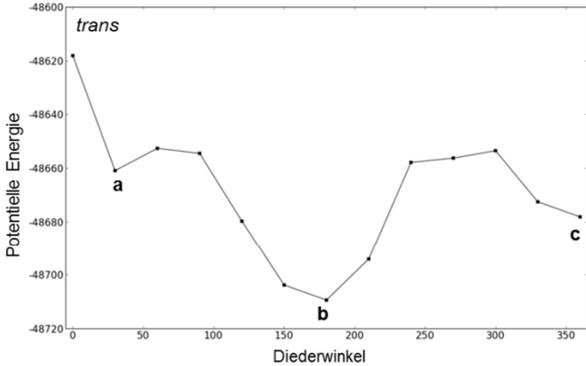
TYR48 open gate-Struktur



TYR137 open gate-Struktur



THR51 open gate-Struktur



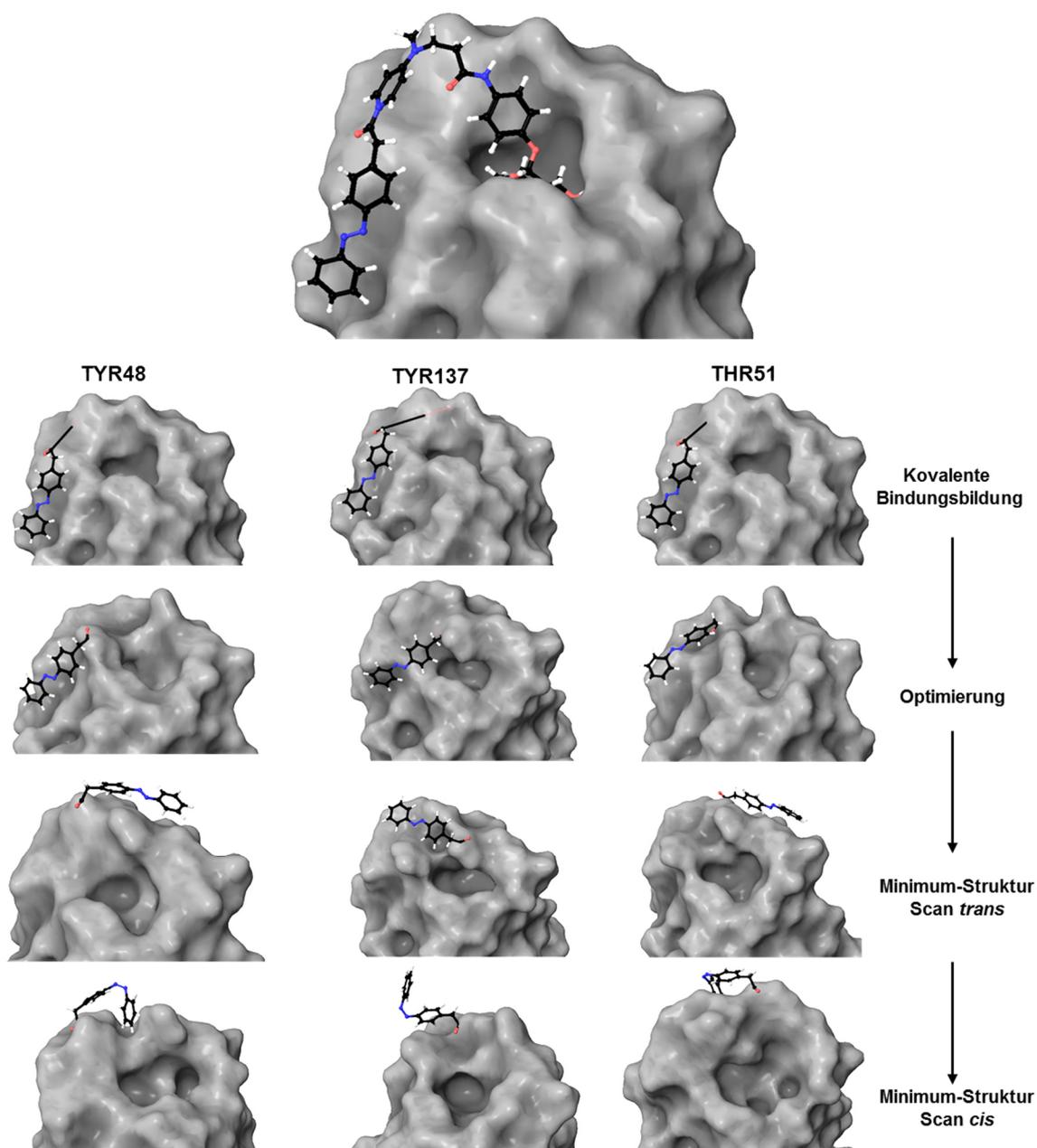


Abb. 131: Übersicht des Prozesses der kovalenten Bindungsbildung und Darstellung der Minimumstrukturen für die Bindung von **52** an TYR48, TYR137 und THR51 in der *closed gate*-Struktur.

Tab. 44: **52** *closed gate*-Struktur. Berechnete Energien nach Verstellung der Diederwinkel 1 und 2 in 30°-Schritten für die Bindung des Azobenzols an TYR48, TYR137 und THR51 in *trans*- und *cis*-Konfiguration.

DW1	DW2	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>
		TYR48	TYR137	THR51	TYR48	TYR137	THR51
0	0	-28982,3	-28906,7	-19486,3	-28917,5	-28693,1	-29048,0
30	0	-29002,8	-28958,8	-19525,4	-28957,2	-28887,5	-29054,5

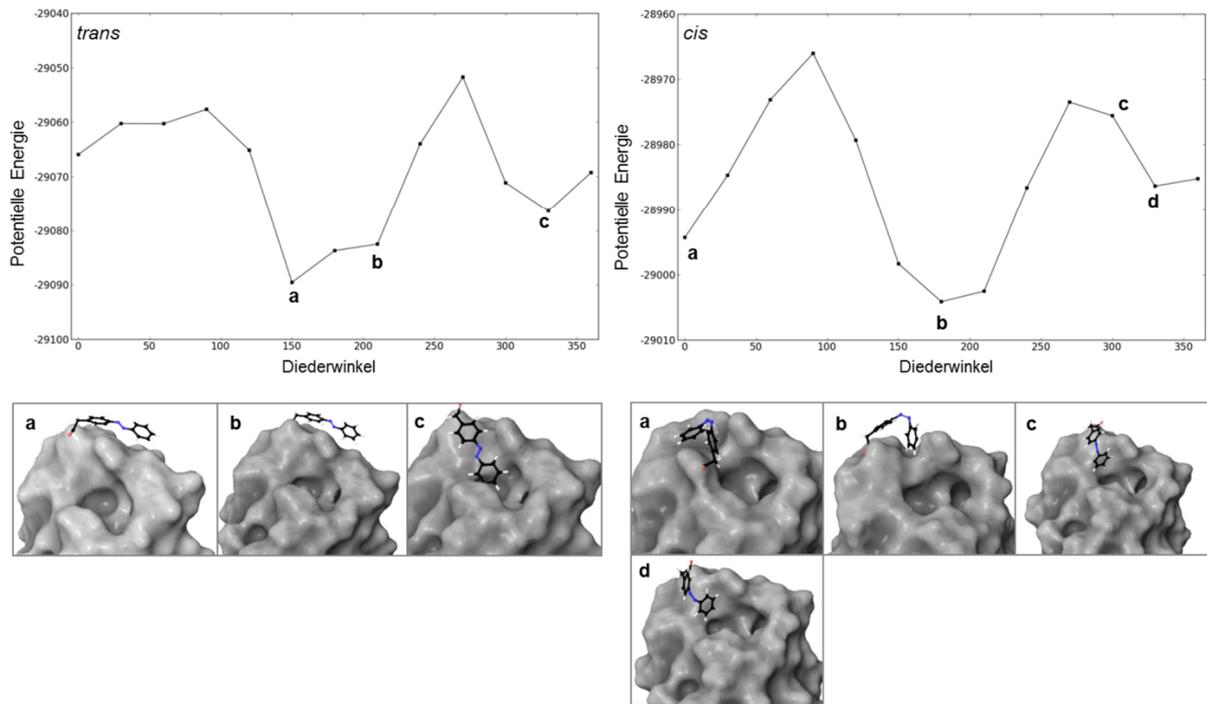
60	0	-29024,0	-28981,6	-19544,9	-28994,3	-28935,0	-29063,3
90	0	-29013,8	-28968,8	-19470,6	-28990,7	-28935,8	-29060,7
120	0	-29006,3	-28952,7	-22625,2	-28970,3	-28912,1	-29063,2
150	0	-29008,4	-28953,3	-22537,0	-28971,2	-28913,0	-29061,6
180	0	-29014,2	-28956,6	-29057,7	-28974,0	-28916,1	-29061,0
210	0	-29010,1	-28953,4	-29053,5	-28970,3	-28912,9	-29054,3
240	0	-29015,3	-28953,3	-29052,8	-28972,7	-28913,3	-29049,7
270	0	-29065,9	-28963,2	-29051,2	-28987,6	-28927,6	-29055,3
300	0	-29063,1	-28970,3	-29054,9	-28990,3	-28928,4	-29060,0
330	0	-29031,2	-28951,2	-29030,6	-28955,7	-28893,3	-29052,1
360	0	-22607,6	-28926,9	-29006,9	-28940,5	-28864,3	-29046,4
0	30	-29023,4	-28948,6	-29007,0	-28945,5	-28863,2	-29020,5
30	30	-29042,7	-28972,7	-29026,7	-28968,4	-28872,0	-29031,5
60	30	-29044,2	-28968,6	-29038,7	-28984,6	-28931,4	-29038,3
90	30	-29038,3	-28955,4	-29039,8	-28968,9	-28920,8	-29046,5
120	30	-29033,9	-28948,7	-29042,4	-28967,0	-28914,6	-29035,8
150	30	-29036,1	-28951,1	-29051,7	-28969,6	-28918,5	-29030,7
180	30	-29036,9	-28952,5	-29051,5	-28971,1	-28922,5	-29031,0
210	30	-29045,9	-28950,3	-29050,2	-28968,6	-28919,5	-29025,5
240	30	-29057,1	-28954,7	-29044,3	-28977,5	-28922,0	-29018,9
270	30	-29060,3	-28966,9	-29046,2	-28984,7	-28934,4	-29014,9
300	30	-29042,3	-28963,5	-29047,4	-28969,0	-28922,5	-29020,6
330	30	-29055,4	-28932,7	-29014,4	-28936,5	-28897,4	-29018,4
360	30	-29046,9	-28948,4	-29007,0	-28935,0	-28876,7	-29018,1
0	60	-17442,6	-28961,9	-29013,6	-28953,0	-28895,5	-28929,0
30	60	-21153,0	-28955,5	-29025,7	-28964,1	-28915,4	-28937,3
60	60	-29053,7	-28950,8	-29031,2	-28970,2	-28915,9	-28950,5
90	60	-29044,1	-28943,1	-29038,9	-28966,4	-28908,3	-28947,8
120	60	-29040,0	-28939,8	-29035,0	-28958,1	-28904,7	-28947,5
150	60	-29041,2	-28940,8	-29038,2	-28959,1	-28907,4	-28949,5
180	60	-29042,5	-28942,1	-29040,1	-28960,4	-28911,4	-28948,5
210	60	-29042,0	-28943,2	-29037,4	-28960,7	-28908,1	-28973,6
240	60	-29043,6	-28956,4	-29036,2	-28969,1	-28911,4	-28977,2
270	60	-29052,7	-28964,9	-29040,5	-28973,1	-28926,9	-28984,0
300	60	-29060,3	-28957,1	-29031,9	-28953,6	-28911,8	-29001,4
330	60	-29046,1	-28951,5	-29012,3	-28942,4	-28880,6	-29000,8
360	60	-17531,8	-28962,0	-29013,7	-28954,8	-28896,1	-28994,1
0	90	-29040,4	-28946,6	-29047,2	-28960,7	-28900,8	-28871,7
30	90	-29045,8	-28943,7	-29049,5	-28957,0	-28905,4	-28870,1
60	90	-29038,6	-28943,3	-29054,6	-28955,7	-28901,8	-28864,0
90	90	-29034,8	-28934,3	-29052,7	-28952,9	-28898,0	-28856,4
120	90	-29031,4	-28930,7	-29051,1	-28949,9	-28895,6	-28857,8
150	90	-29032,2	-28931,2	-29052,8	-28950,5	-28900,1	-28849,4

180	90	-29033,5	-28932,5	-29054,9	-28952,6	-28897,7	-28848,8
210	90	-29033,1	-28932,4	-29066,4	-28964,1	-28896,0	-28851,4
240	90	-29034,2	-28949,4	-29075,0	-28957,9	-28897,3	-28858,6
270	90	-29036,3	-28961,5	-29076,2	-28966,0	-28917,7	-28869,3
300	90	-29057,6	-28962,0	-29067,2	-28962,8	-28914,5	-28881,2
330	90	-29047,6	-28946,6	-29060,6	-28957,1	-28899,0	-28876,4
360	90	-17424,5	-28945,5	-29053,2	-28961,0	-28900,5	-28868,1
0	120	-29052,9	-28950,9	-29068,5	-28967,0	-28911,2	-28782,6
30	120	-29050,3	-28959,9	-29071,4	-28971,1	-28911,2	-28789,1
60	120	-29052,8	-28948,1	-29074,4	-28971,0	-28911,5	-28786,5
90	120	-29052,9	-28945,4	-29072,8	-28967,6	-28920,8	-28782,0
120	120	-29049,4	-28942,5	-29071,0	-28964,0	-28920,4	-28769,4
150	120	-29049,8	-28943,2	-29073,4	-28965,7	-28919,1	-28756,9
180	120	-29051,2	-28945,3	-29074,5	-28973,2	-28917,7	-28755,7
210	120	-29047,8	-28951,2	-29074,0	-28979,3	-28919,0	-28758,6
240	120	-29053,2	-28948,1	-29079,9	-28967,2	-28927,5	-28769,0
270	120	-29058,7	-28952,6	-29085,8	-28977,0	-28938,9	-28773,9
300	120	-29060,4	-28970,0	-29093,2	-28978,6	-28938,0	-28773,5
330	120	-29065,1	-28962,5	-29079,7	-28977,0	-28929,9	-28775,3
360	120	-29062,9	-28961,0	-29068,6	-28967,8	-28914,6	-28781,6
0	150	-29076,8	-28972,5	-29091,8	-28980,7	-28948,9	-28715,9
30	150	-29063,5	-28960,3	-29096,1	-28987,9	-28953,3	-28719,0
60	150	-29068,4	-28958,2	-29102,4	-28990,8	-28954,2	-28714,5
90	150	-29065,3	-28956,3	-29104,5	-28990,3	-28947,7	-28708,6
120	150	-29062,0	-28953,6	-29102,2	-28984,1	-28935,0	-28693,3
150	150	-29062,5	-28954,4	-29100,7	-28984,9	-28936,0	-28678,4
180	150	-29063,7	-28955,5	-29101,4	-28987,9	-28934,6	-28679,5
210	150	-29067,7	-28954,9	-29098,5	-28991,3	-28932,8	-28686,2
240	150	-29072,6	-28966,2	-29096,8	-28992,3	-28932,9	-28697,9
270	150	-29084,8	-28984,7	-29097,9	-28988,4	-28937,8	-28705,2
300	150	-29089,6	-28986,5	-29098,5	-28998,4	-28941,8	-28706,3
330	150	-29084,4	-28979,2	-29094,1	-28988,0	-28937,9	-28712,0
360	150	-29076,7	-28972,6	-29091,6	-28979,9	-28941,5	-28715,6
0	180	-29080,6	-28963,6	-29102,7	-28987,1	-28943,0	-28685,4
30	180	-29082,7	-28965,1	-29102,5	-29000,7	-28946,3	-28686,7
60	180	-29071,4	-28971,1	-29107,0	-29004,1	-28950,4	-28677,5
90	180	-29073,2	-28961,1	-29108,2	-28997,9	-28946,9	-28682,8
120	180	-29068,4	-28959,5	-29106,4	-28989,1	-28940,0	-28669,9
150	180	-29068,0	-28960,2	-29107,1	-28990,4	-28936,5	-28655,3
180	180	-29069,0	-28961,6	-29112,6	-28992,5	-28929,3	-28638,3
210	180	-29067,8	-28960,5	-29109,7	-28996,2	-28940,0	-28645,2
240	180	-29067,5	-28960,3	-29103,9	-28993,1	-28939,6	-28660,6
270	180	-29071,4	-28963,3	-29105,1	-28997,1	-28943,9	-28667,8
300	180	-29081,0	-28964,5	-29106,6	-29002,7	-28948,4	-28670,4

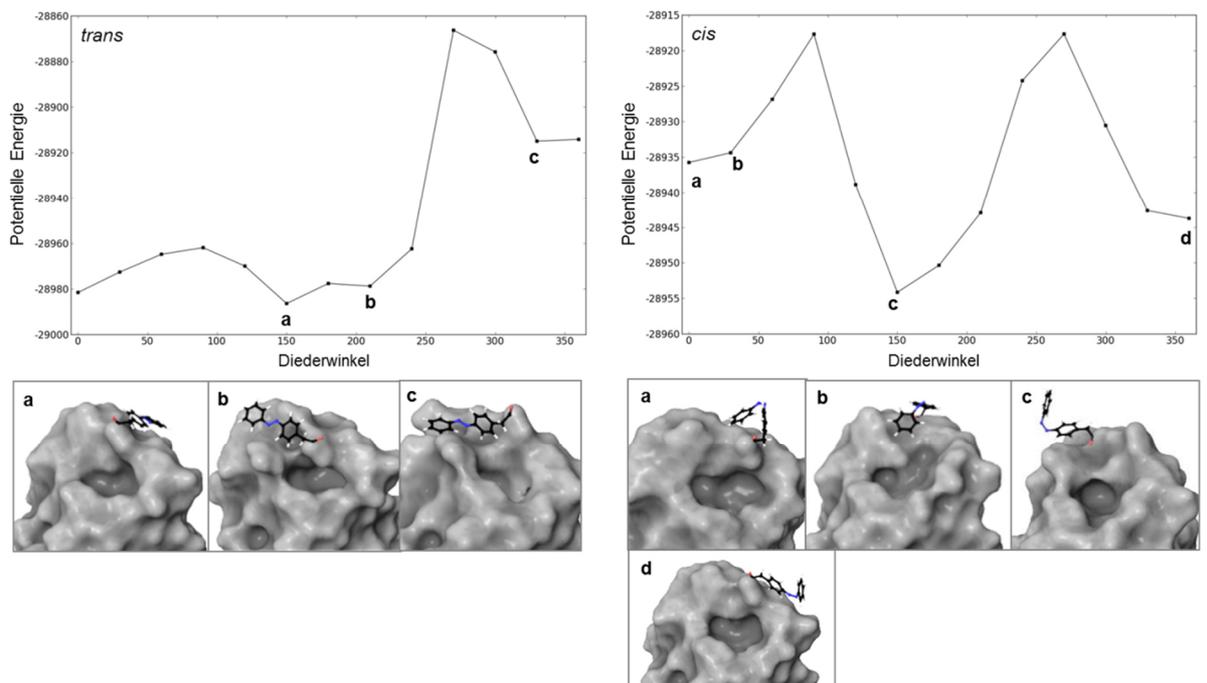
330	180	-29083,7	-28977,7	-29105,4	-28993,2	-28946,8	-28674,7
360	180	-29081,0	-28963,7	-29100,2	-28985,8	-28943,1	-28682,4
0	210	-29070,8	-28956,7	-29084,7	-28979,0	-28929,4	-28714,2
30	210	-29074,9	-28969,7	-29080,4	-28996,1	-28931,5	-28714,9
60	210	-29081,5	-28978,8	-29082,2	-29002,5	-28937,7	-28716,6
90	210	-29082,5	-28977,7	-29079,8	-28999,7	-28939,5	-28713,2
120	210	-29073,0	-28964,9	-29084,2	-28982,7	-28935,7	-28701,0
150	210	-29064,6	-28950,1	-29086,7	-28981,8	-28932,8	-28690,7
180	210	-29068,9	-28955,9	-29085,9	-28986,0	-28930,8	-28681,2
210	210	-29068,6	-28954,9	-29091,3	-28988,9	-28923,1	-28674,1
240	210	-29067,2	-28954,2	-29092,4	-28983,9	-28931,4	-28689,8
270	210	-29070,0	-28957,0	-29093,1	-28985,3	-28941,9	-28699,7
300	210	-29071,5	-28957,4	-29094,8	-28987,0	-28942,9	-28703,8
330	210	-29068,9	-28960,6	-29089,8	-28983,2	-28939,0	-28707,8
360	210	-29068,6	-28957,4	-29084,9	-28990,1	-28935,9	-28714,1
0	240	-29052,8	-28948,4	-29045,3	-28973,1	-28915,5	-28781,6
30	240	-29056,9	-28953,9	-29043,2	-28983,5	-28919,5	-28780,1
60	240	-29054,0	-28961,7	-29039,5	-28986,6	-28919,1	-28782,9
90	240	-29058,7	-28962,5	-29031,8	-28981,7	-28924,3	-28779,4
120	240	-29064,0	-28956,1	-29032,4	-28958,5	-28921,0	-28769,5
150	240	-29050,4	-28956,4	-29081,4	-28971,1	-28919,5	-28762,9
180	240	-29050,5	-28944,3	-29088,2	-28970,5	-28921,0	-28756,1
210	240	-29052,5	-28937,8	-29087,0	-28966,2	-28912,3	-28749,3
240	240	-29051,0	-28935,7	-29088,8	-28965,2	-28909,7	-28761,5
270	240	-29054,3	-28941,4	-29110,6	-28968,0	-28911,7	-28770,1
300	240	-29056,9	-28957,2	-29120,6	-28973,0	-28923,3	-28775,2
330	240	-29054,6	-28904,5	-29106,0	-28973,3	-28917,2	-28778,9
360	240	-29053,2	-28893,4	-29099,0	-28973,1	-28915,3	-28781,5
0	270	-29027,3	-21170,6	-29073,8	-28964,4	-28896,9	-28863,7
30	270	-29021,1	-28851,7	-29071,6	-28963,8	-28892,6	-28859,8
60	270	-29039,5	-28861,9	-29068,3	-28957,8	-28903,8	-28864,0
90	270	-29051,7	-28847,0	-29070,1	-28973,5	-28907,3	-28859,6
120	270	-29051,6	-28852,4	-29067,8	-28969,0	-28908,3	-28853,6
150	270	-29041,2	-28858,0	-29068,7	-28955,2	-28917,7	-28851,3
180	270	-29039,4	-28848,5	-29068,5	-28954,4	-28917,0	-28846,3
210	270	-29037,9	-28841,9	-29067,9	-28953,0	-28914,0	-28841,0
240	270	-29037,0	-28835,9	-29066,9	-28952,6	-28912,8	-28849,9
270	270	-29038,9	-28842,0	-29086,5	-28955,5	-28914,9	-28855,4
300	270	-29039,6	-28857,5	-29071,8	-28958,5	-28916,3	-28861,3
330	270	-29037,8	-28866,3	-29088,4	-28965,6	-28914,2	-28863,8
360	270	-29035,6	-21152,0	-29078,2	-28963,9	-28914,7	-28863,8
0	300	-29052,6	-28840,3	-29055,2	-28960,9	-28920,8	-28957,4
30	300	-29059,4	-28838,4	-29070,4	-28946,4	-28911,7	-28946,9

60	300	-29071,1	-28860,6	-29085,9	-28952,8	-28924,6	-28953,7
90	300	-29058,8	-28862,4	-29086,0	-28975,6	-28929,1	-28962,1
120	300	-29050,4	-28864,1	-29077,6	-28970,9	-28926,1	-28964,5
150	300	-29049,0	-28867,7	-29075,3	-28958,9	-28922,7	-28973,3
180	300	-29044,7	-28867,9	-29075,5	-28959,1	-28920,7	-28966,5
210	300	-29042,7	-28854,7	-29074,5	-28958,3	-28918,7	-28964,2
240	300	-29041,7	-28853,6	-29073,7	-28957,9	-28917,4	-28966,2
270	300	-29045,2	-28862,9	-29077,5	-28961,9	-28920,0	-28969,7
300	300	-29048,6	-28875,8	-29092,4	-28970,8	-28923,7	-28973,9
330	300	-29044,4	-28873,3	-29081,6	-28972,8	-28930,6	-28961,8
360	300	-29040,1	-21142,3	-29059,6	-28960,9	-28919,1	-28957,5
0	330	-29052,6	-28832,5	-29066,0	-28942,0	-28905,1	-29032,5
30	330	-29060,3	-28851,2	-29076,4	-28934,0	-28910,5	-29027,2
60	330	-29076,4	-28895,6	-29103,6	-28965,5	-28932,3	-29033,6
90	330	-29067,5	-28893,6	-29098,5	-28986,3	-28938,3	-29042,3
120	330	-29057,4	-28906,4	-29088,9	-28973,5	-28929,7	-29042,2
150	330	-29053,8	-28903,2	-29085,4	-28968,4	-28926,8	-29051,7
180	330	-29056,4	-28890,5	-29088,8	-28970,2	-28929,3	-29051,6
210	330	-29055,4	-28879,9	-29088,4	-28969,2	-28928,1	-29045,8
240	330	-29052,9	-28899,5	-29086,4	-28967,0	-28925,6	-29046,4
270	330	-29057,5	-28905,5	-29088,0	-28972,3	-28941,3	-29046,4
300	330	-29060,8	-28914,9	-29093,2	-28984,5	-28942,6	-29048,0
330	330	-29056,9	-28890,4	-29071,2	-28973,8	-28932,3	-29043,0
360	330	-29013,6	-21141,3	-29064,2	-28941,8	-28905,0	-29037,7
0	360	-29052,7	-28851,0	-29076,4	-28925,8	-28902,0	-29063,1
30	360	-29066,3	-28862,8	-29097,4	-28948,2	-28920,9	-29062,9
60	360	-29069,2	-28889,4	-29110,7	-28985,0	-28940,6	-29067,3
90	360	-29064,0	-28914,1	-29102,7	-28982,7	-28936,4	-29068,6
120	360	-29055,4	-28907,4	-29093,3	-28971,1	-28929,2	-29066,3
150	360	-29056,9	-28900,9	-29093,9	-28970,8	-28930,1	-29067,1
180	360	-29060,3	-28888,5	-29099,2	-28974,1	-28933,3	-29072,3
210	360	-29056,9	-28878,9	-29096,3	-28971,0	-28929,9	-29069,4
240	360	-29056,1	-28906,9	-29092,3	-28970,4	-28940,9	-29064,2
270	360	-29062,0	-28881,1	-29093,1	-28985,0	-28943,8	-29065,5
300	360	-29066,7	-19420,3	-29088,8	-28985,2	-28942,8	-29067,2
330	360	-23123,5	-28851,9	-29085,5	-28953,0	-28914,5	-29065,9
360	360	-28997,9	-28841,5	-29077,0	-28925,8	-28902,2	-29062,9

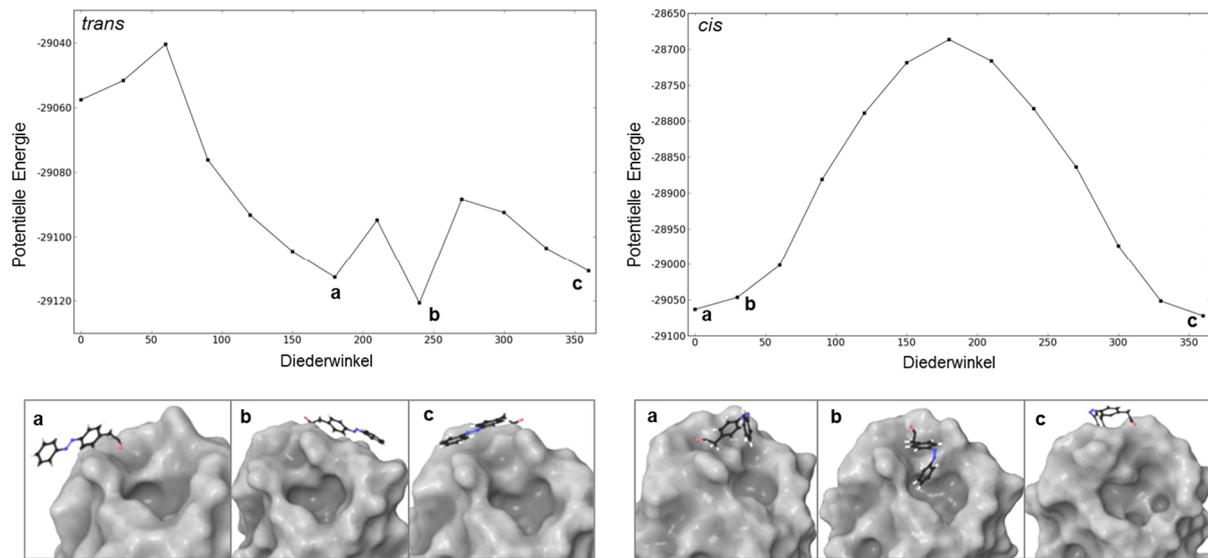
TYR48 *closed gate*-Struktur



TYR137 *closed gate*-Struktur



THR51 closed gate-Struktur



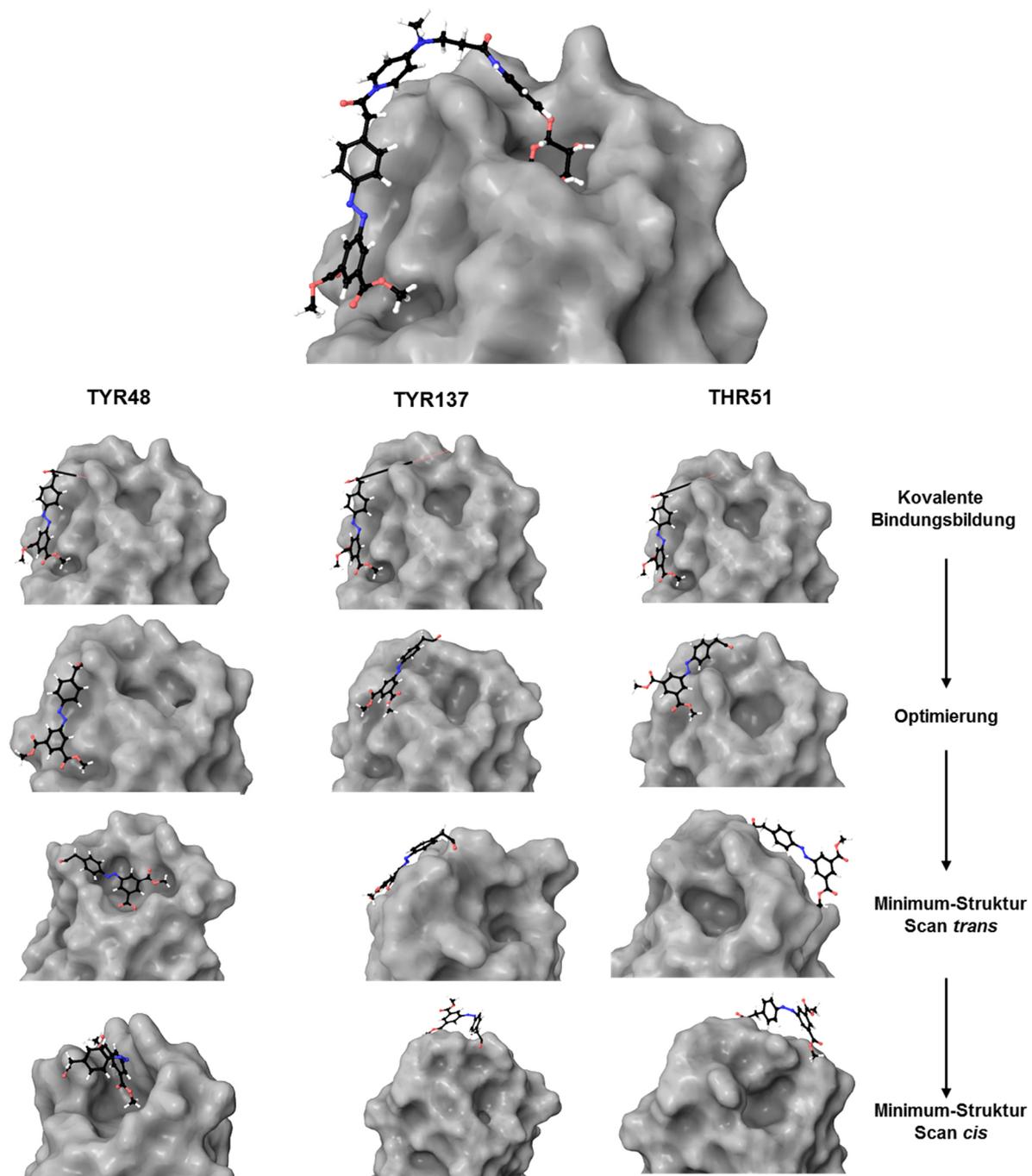


Abb. 132: Übersicht des Prozesses der kovalenten Bindungsbildung und Darstellung der Minimumstrukturen für die Bindung von **53** an TYR48, TYR137 und THR51 in der *open gate*-Struktur.

Tab. 45: 53 open *gate*-Struktur. Berechnete Energien nach Verstellung der Diederwinkel 1 und 2 in 30°- Schritten für die Bindung des Azobenzols an TYR48, TYR137 und THR51 in *trans*- und *cis*-Konfiguration.

DW1	DW2	<i>trans</i> TYR48	<i>trans</i> TYR137	<i>trans</i> THR51	<i>cis</i> TYR48	<i>cis</i> TYR137	<i>cis</i> THR51
0	0	-48431,4	-39063,9	-48581,7	-48385,0	-38865,6	-48453,6
30	0	-48413,2	-48561,7	-48642,5	-48408,5	-48533,6	-48452,6
60	0	-48437,6	-48596,8	-48675,0	-48431,4	-48551,3	-48477,8
90	0	-48453,3	-48599,4	-48670,0	-48426,9	-48548,8	-48519,0
120	0	-48501,1	-48594,6	-48647,0	-48415,2	-48541,8	-48510,0
150	0	-48502,5	-48595,5	-48655,0	-48436,9	-48542,3	-48529,6
180	0	-48505,2	-48599,4	-48667,6	-48447,7	-48544,9	-48544,5
210	0	-48500,6	-48601,4	-48657,7	-48449,4	-48540,6	-48570,3
240	0	-48504,3	-48551,0	-48660,7	-48441,8	-48572,6	-48593,2
270	0	-48528,0	-48558,4	-48659,0	-48467,1	-48548,0	-48572,8
300	0	-48542,2	-48552,8	-48638,4	-48454,4	-48580,6	-48614,8
330	0	-48530,9	-48457,6	-48662,8	-48414,0	-48555,0	-48620,2
360	0	-48442,2	-48461,3	-48651,3	-48391,8	-48537,6	-48607,1
0	30	-48452,3	-48532,1	-48658,1	-48381,9	-48536,1	-48601,4
30	30	-48443,0	-48561,5	-48675,0	-48476,2	-48563,3	-48608,2
60	30	-48453,4	-48575,5	-48664,5	-48489,6	-48572,3	-48624,4
90	30	-48450,4	-48585,1	-48655,7	-48503,3	-48561,4	-48614,0
120	30	-48445,9	-48557,5	-48648,1	-48504,4	-48555,9	-48613,5
150	30	-48448,3	-48565,0	-48653,5	-48504,2	-48556,9	-48609,8
180	30	-48449,1	-48564,3	-48656,3	-48509,0	-48558,0	-48598,6
210	30	-48446,9	-48565,6	-48652,6	-48496,9	-48554,8	-48610,6
240	30	-48480,6	-48577,8	-48656,4	-48498,1	-48556,5	-48607,9
270	30	-48481,8	-48576,0	-48671,9	-48492,4	-48582,7	-48585,7
300	30	-48407,2	-48527,7	-48675,2	-48495,0	-48567,9	-48558,2
330	30	-48433,9	-48496,1	-48659,6	-48459,6	-48545,8	-48518,2
360	30	-48432,3	-48481,1	-48660,5	-48465,5	-48541,0	-48514,6
0	60	-48428,6	-48526,0	-48666,8	-48477,6	-48552,3	-48595,0
30	60	-48437,5	-48543,8	-48655,8	-48490,9	-48559,1	-48642,9
60	60	-48442,7	-48537,3	-48655,5	-48493,8	-48556,9	-48628,3
90	60	-48439,0	-48538,3	-48649,2	-48480,7	-48552,1	-48600,8
120	60	-48435,3	-48520,3	-48644,6	-48470,8	-48546,9	-48606,4
150	60	-48436,4	-48523,6	-48645,7	-48480,2	-48547,2	-48603,2
180	60	-48437,2	-48527,0	-48645,6	-48492,7	-48548,5	-48603,8
210	60	-48467,1	-48529,6	-48647,0	-48503,8	-48547,8	-48604,0
240	60	-41897,4	-48544,3	-48649,9	-48521,0	-48549,8	-48589,1
270	60	-48441,4	-48546,3	-48667,0	-48513,8	-48563,8	-48605,0
300	60	-48435,8	-48537,4	-48670,6	-48494,2	-48559,2	-48576,3

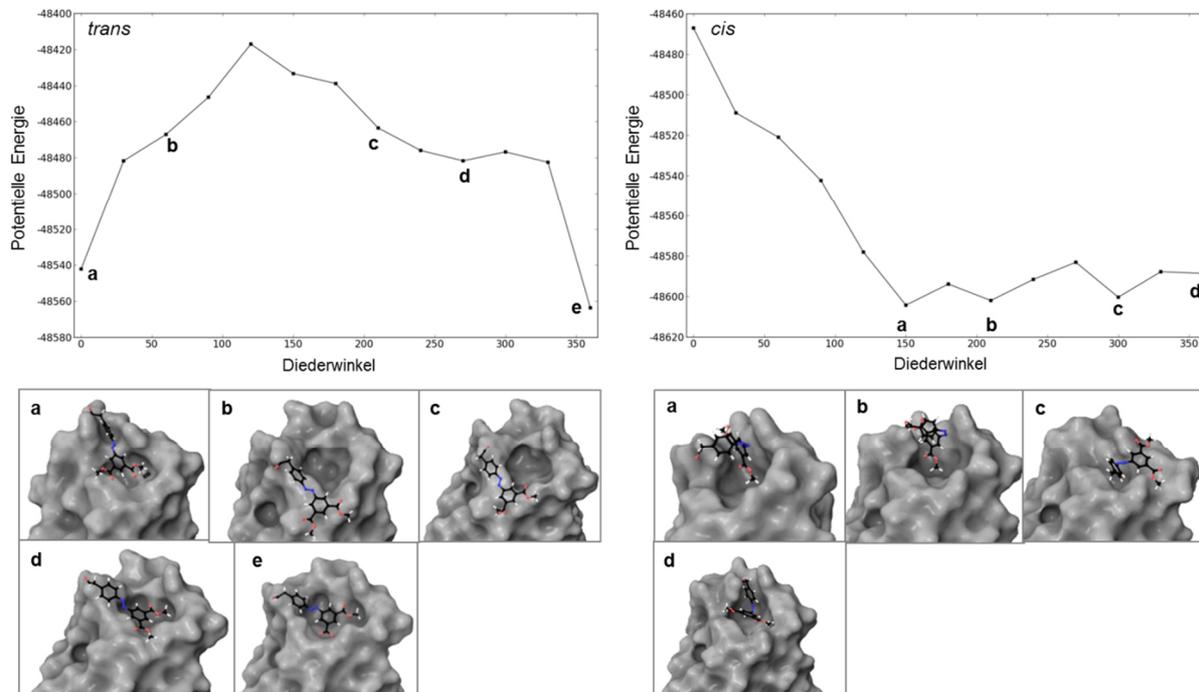
330	60	-48424,4	-48527,9	-48657,1	-48486,7	-48546,7	-48553,3
360	60	-48430,1	-48551,0	-48668,3	-48503,3	-48552,9	-48554,8
0	90	-48403,9	-48562,3	-48648,8	-48521,1	-48554,6	-48603,3
30	90	-48404,8	-48554,2	-48646,7	-48528,3	-48561,7	-48599,4
60	90	-48407,7	-48546,4	-48668,3	-48510,4	-48560,9	-48588,9
90	90	-48404,9	-48531,3	-48660,2	-48528,3	-48549,5	-48583,2
120	90	-48401,7	-48519,2	-48637,8	-48502,3	-48541,6	-48586,1
150	90	-48402,0	-48519,5	-48637,9	-48506,3	-48539,7	-48594,5
180	90	-48402,9	-48519,3	-48639,2	-48508,6	-48540,5	-48594,0
210	90	-48401,7	-48517,8	-48639,2	-48514,8	-48539,4	-48594,5
240	90	-48402,4	-48518,7	-48641,6	-48542,4	-48541,3	-48606,8
270	90	-48446,5	-48557,9	-48667,4	-48534,0	-48556,8	-48603,3
300	90	-48437,7	-48547,5	-48669,4	-48525,9	-48554,0	-48586,6
330	90	-48430,1	-48546,9	-48671,4	-48506,5	-48555,0	-48570,3
360	90	-48403,3	-48538,7	-48649,1	-48493,5	-48555,0	-48605,3
0	120	-48410,0	-48566,9	-48674,2	-48506,6	-48569,2	-48620,3
30	120	-48412,2	-48555,6	-48687,5	-48475,1	-48566,2	-48612,2
60	120	-48414,6	-48546,9	-48687,2	-48453,0	-48567,8	-48605,0
90	120	-48413,8	-48532,2	-48684,5	-48554,7	-48555,7	-48609,5
120	120	-48411,1	-48531,7	-48667,9	-48570,1	-48551,8	-48601,0
150	120	-48411,9	-48530,8	-48657,2	-48568,7	-48550,4	-48605,6
180	120	-48413,1	-48532,0	-48658,3	-48569,4	-48550,8	-48614,4
210	120	-48412,4	-48532,1	-48657,6	-48565,7	-48549,6	-48616,5
240	120	-48412,3	-48534,6	-48658,9	-48576,5	-48550,9	-48620,6
270	120	-48415,1	-48560,6	-48663,4	-48578,1	-48566,9	-48623,2
300	120	-48417,0	-48570,8	-48665,8	-48553,4	-48571,8	-48638,5
330	120	-48414,3	-48574,5	-48666,2	-48573,6	-48571,3	-48635,6
360	120	-48410,0	-48558,8	-48674,4	-48567,0	-48569,5	-48620,2
0	150	-48425,0	-48564,8	-48704,0	-48587,5	-48577,1	-48617,5
30	150	-48426,8	-48567,8	-48716,6	-48590,3	-48581,4	-48622,6
60	150	-48430,0	-48559,4	-48723,7	-48586,7	-48581,5	-48614,1
90	150	-48429,0	-48559,9	-48703,2	-48581,3	-48574,5	-48620,4
120	150	-48427,1	-48555,7	-48697,8	-48572,7	-48562,9	-48608,3
150	150	-48428,2	-48556,1	-48681,1	-48567,8	-48566,9	-48628,4
180	150	-48429,7	-48557,1	-48682,6	-48574,0	-48567,5	-48640,2
210	150	-48428,8	-48558,6	-48681,6	-48576,1	-48566,3	-48641,2
240	150	-48429,1	-48567,9	-48682,1	-48577,3	-48566,8	-48640,4
270	150	-48432,4	-48575,5	-48684,8	-48589,1	-48588,9	-48658,4
300	150	-48433,4	-48585,4	-48704,1	-48604,3	-48586,8	-48660,9
330	150	-48428,8	-48577,0	-48705,0	-48601,6	-48585,0	-48647,9
360	150	-48424,4	-48570,6	-48701,4	-48593,6	-48577,4	-48639,7
0	180	-48429,8	-48588,7	-48706,3	-48591,2	-48582,9	-48648,2
30	180	-48430,9	-48588,1	-48689,8	-48599,1	-48583,3	-48650,4

60	180	-48434,1	-48587,5	-48715,4	-48597,0	-48583,1	-48662,9
90	180	-48434,5	-48582,0	-48724,3	-48596,7	-48579,0	-48652,6
120	180	-48433,4	-48579,2	-48716,1	-48592,8	-48587,4	-48650,2
150	180	-48435,0	-48578,9	-48690,7	-48588,0	-48584,8	-48653,8
180	180	-48436,8	-48580,1	-48689,8	-48585,0	-48580,0	-48652,9
210	180	-48435,9	-48579,3	-48688,9	-48582,4	-48575,3	-48649,2
240	180	-48435,6	-48580,0	-48689,0	-48578,9	-48573,0	-48649,2
270	180	-48438,3	-48584,5	-48692,4	-48593,9	-48574,6	-48661,1
300	180	-48438,9	-48621,4	-48714,3	-48602,2	-48575,7	-48665,1
330	180	-48434,0	-48656,0	-48709,1	-48600,7	-48572,2	-48655,0
360	180	-48429,1	-48649,6	-48709,0	-48598,3	-48568,7	-48639,6
0	210	-48421,0	-48632,3	-48705,1	-48588,7	-48563,0	-48601,4
30	210	-48437,5	-48643,5	-48674,1	-48589,7	-48589,0	-48591,9
60	210	-48456,2	-48653,0	-48693,1	-48588,2	-48588,9	-48552,6
90	210	-48463,5	-48662,1	-48696,6	-48602,0	-48587,7	-48572,0
120	210	-48445,4	-48652,2	-48676,9	-48589,0	-48582,8	-48569,9
150	210	-48428,6	-48633,1	-48674,9	-48586,0	-48583,3	-48584,5
180	210	-48430,2	-48634,3	-48675,0	-48579,6	-48580,3	-48582,8
210	210	-48429,4	-48611,2	-48673,8	-48569,5	-48570,8	-48579,1
240	210	-48428,8	-48613,6	-48673,5	-48560,4	-48569,2	-48574,2
270	210	-48431,3	-48615,9	-48682,0	-48575,2	-48570,2	-48581,0
300	210	-48431,8	-48617,5	-48704,4	-48587,8	-48570,7	-48574,5
330	210	-48426,3	-48614,0	-48703,9	-48590,9	-48566,9	-48567,9
360	210	-48420,9	-48613,4	-48691,5	-48589,0	-48565,3	-48547,8
0	240	-48419,5	-48610,0	-48649,5	-48567,8	-48556,9	-48525,1
30	240	-48442,2	-48624,1	-39109,0	-48579,8	-48569,4	-48530,4
60	240	-48445,9	-48633,9	-48545,2	-48586,3	-48575,6	-48531,4
90	240	-48433,7	-48636,1	-48620,1	-48591,6	-48574,1	-48552,0
120	240	-48415,0	-48648,3	-48614,6	-48585,7	-48572,2	-48552,5
150	240	-48411,7	-48633,8	-48612,4	-48567,2	-48566,4	-48554,1
180	240	-48413,5	-48622,4	-48599,3	-48560,7	-48566,3	-48554,3
210	240	-48412,5	-48599,6	-48633,3	-48545,6	-48558,7	-48551,6
240	240	-48411,9	-48597,5	-48627,0	-48534,5	-48553,3	-48552,3
270	240	-48414,1	-48599,2	-48630,5	-48573,5	-48555,4	-48555,1
300	240	-48414,9	-48600,4	-48631,4	-48583,4	-48555,1	-48555,2
330	240	-48425,0	-48599,1	-48629,1	-48586,9	-48551,7	-48551,7
360	240	-48476,0	-48601,0	-48626,6	-48582,3	-48555,3	-48551,7
0	270	-48475,8	-48594,5	-48605,5	-48583,1	-48554,4	-48565,7
30	270	-48481,7	-48599,5	-48635,3	-48570,8	-48559,5	-48566,7
60	270	-48464,3	-48613,2	-48646,0	-48570,5	-48558,2	-48567,2
90	270	-48446,0	-48624,7	-48636,7	-48570,8	-48561,5	-48570,6
120	270	-48437,8	-48626,7	-48667,3	-48572,8	-48556,7	-48568,5
150	270	-48438,1	-48614,9	-48663,5	-48554,3	-48547,2	-48571,1
180	270	-48439,0	-48607,9	-48662,9	-48553,4	-48545,9	-48570,1

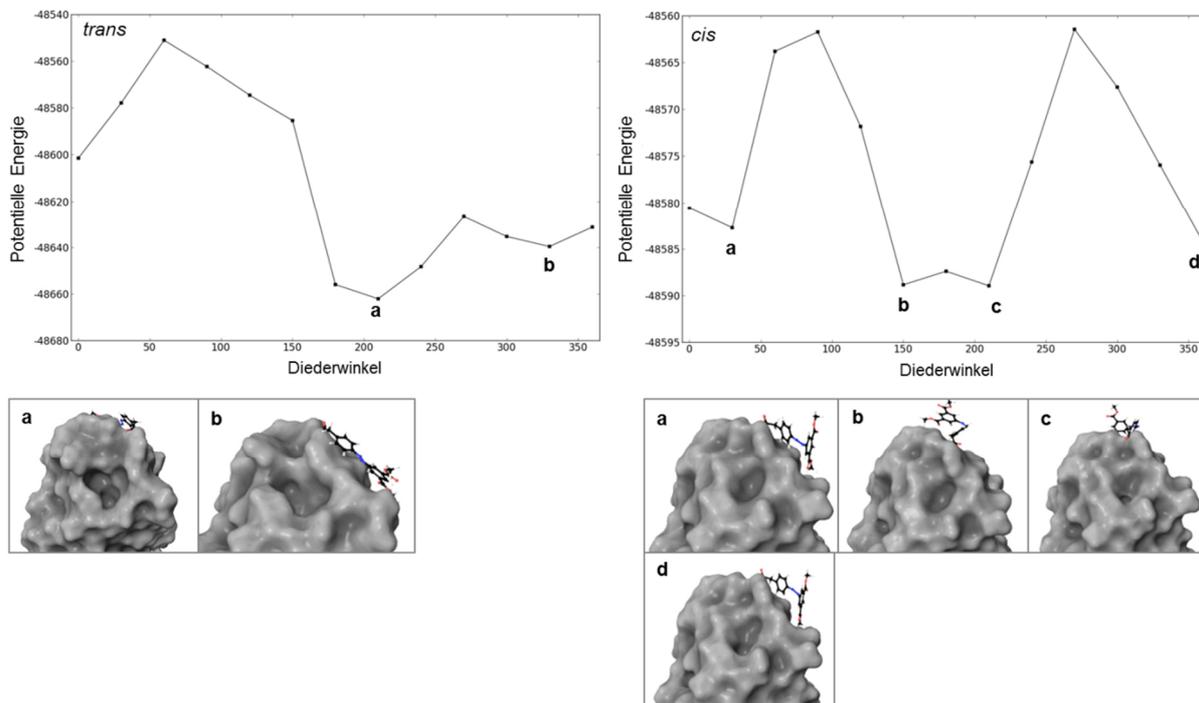
210	270	-48437,6	-48589,6	-48661,8	-48557,0	-48543,8	-48568,2
240	270	-48436,6	-48586,0	-48661,4	-48559,5	-48543,2	-48566,4
270	270	-48439,7	-48586,4	-48665,1	-48567,8	-48546,4	-48588,2
300	270	-48447,5	-48588,1	-48668,9	-48562,5	-48549,0	-48582,1
330	270	-48474,6	-48588,7	-48669,5	-48549,2	-48546,8	-48574,6
360	270	-48462,3	-48593,4	-48667,2	-48555,3	-48545,2	-48573,2
0	300	-48463,8	-48603,6	-48682,5	-48542,4	-48552,8	-48551,7
30	300	-48444,8	-48602,5	-48643,5	-48543,1	-48554,7	-48561,8
60	300	-48444,0	-48632,9	-48695,9	-48548,9	-48560,4	-48575,2
90	300	-48450,5	-48635,3	-48690,0	-48557,2	-48567,6	-48583,4
120	300	-48435,4	-48621,4	-48682,2	-48554,2	-48565,6	-48580,9
150	300	-48435,3	-48604,3	-48676,9	-48571,5	-48554,9	-48576,8
180	300	-48436,0	-48599,6	-48676,4	-48563,7	-48553,2	-48576,5
210	300	-48434,7	-48598,4	-48677,1	-48547,0	-48551,9	-48575,3
240	300	-48433,2	-48597,1	-48676,6	-48592,4	-48550,9	-48574,0
270	300	-48435,9	-48600,8	-48679,4	-48600,4	-48554,3	-48578,3
300	300	-48476,8	-48604,2	-48706,3	-48591,4	-48558,1	-48583,8
330	300	-48469,0	-48603,1	-48706,3	-48573,0	-48554,7	-48574,8
360	300	-48462,9	-48607,0	-48684,1	-48563,8	-48548,5	-48552,0
0	330	-48452,9	-48592,2	-48644,7	-48564,7	-48549,1	-48564,3
30	330	-48450,5	-48618,7	-48674,6	-48546,4	-48548,0	-48567,0
60	330	-48451,8	-48639,7	-48705,6	-48553,3	-48562,5	-48591,0
90	330	-48444,4	-48636,0	-48698,3	-48561,7	-48575,9	-48594,9
120	330	-48437,3	-48621,7	-48694,3	-48558,3	-48567,8	-48590,7
150	330	-48436,6	-48607,2	-48690,5	-48552,0	-48565,8	-48585,9
180	330	-48439,9	-48609,6	-48694,0	-48557,2	-48563,5	-48588,9
210	330	-48438,0	-48608,2	-48692,9	-48552,1	-48561,0	-48588,4
240	330	-48435,1	-48605,6	-48690,7	-48557,4	-48558,1	-48586,0
270	330	-48447,4	-48610,3	-48708,5	-48587,8	-48562,6	-48588,7
300	330	-48464,1	-48613,0	-48721,2	-48580,3	-48566,7	-48586,9
330	330	-48482,5	-48617,1	-48697,3	-48542,9	-48559,7	-48582,1
360	330	-48478,8	-48599,8	-48659,5	-48492,4	-48548,7	-48564,2
0	360	-48511,4	-48611,6	-48634,7	-48462,0	-48541,3	-48566,3
30	360	-48512,2	-48629,2	-48692,5	-48476,9	-48551,9	-48581,1
60	360	-48515,3	-48628,6	-48711,0	-48520,5	-48576,9	-48602,1
90	360	-48514,2	-48631,3	-48705,6	-48586,3	-48576,6	-48594,7
120	360	-48509,2	-48609,7	-48694,9	-48570,0	-48563,4	-48584,7
150	360	-48511,0	-48609,0	-48697,0	-48575,9	-48566,3	-48590,7
180	360	-48515,1	-48612,2	-48701,3	-48574,1	-48566,1	-48593,4
210	360	-48512,7	-48609,0	-48698,3	-48567,0	-48562,2	-48587,6
240	360	-48511,6	-48607,9	-48692,7	-48558,7	-48560,4	-48591,4
270	360	-48541,2	-48614,4	-48692,8	-48568,0	-48580,0	-48603,0
300	360	-48563,7	-48624,3	-48701,4	-48588,6	-48584,2	-48600,6

330	360	-48535,8	-48608,9	-48672,3	-48563,8	-48558,9	-48581,4
360	360	-48520,3	-48614,7	-48652,7	-48378,5	-48541,5	-48565,7

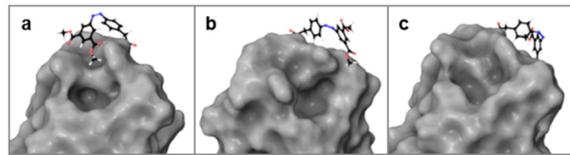
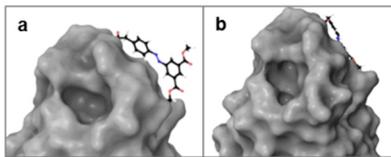
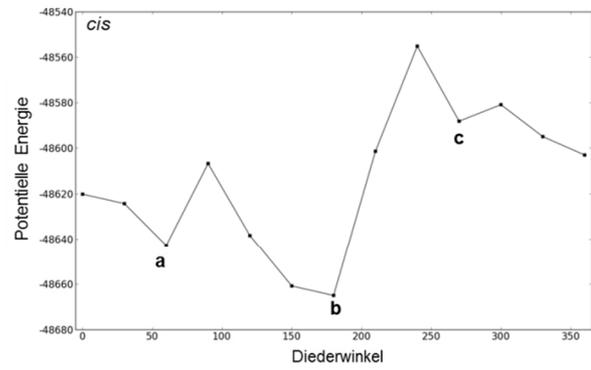
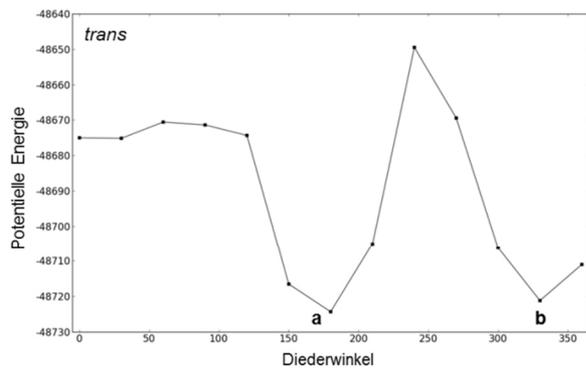
TYR48 *open gate*-Struktur



TYR137 *open gate*-Struktur



THR51 *open gate*-Struktur



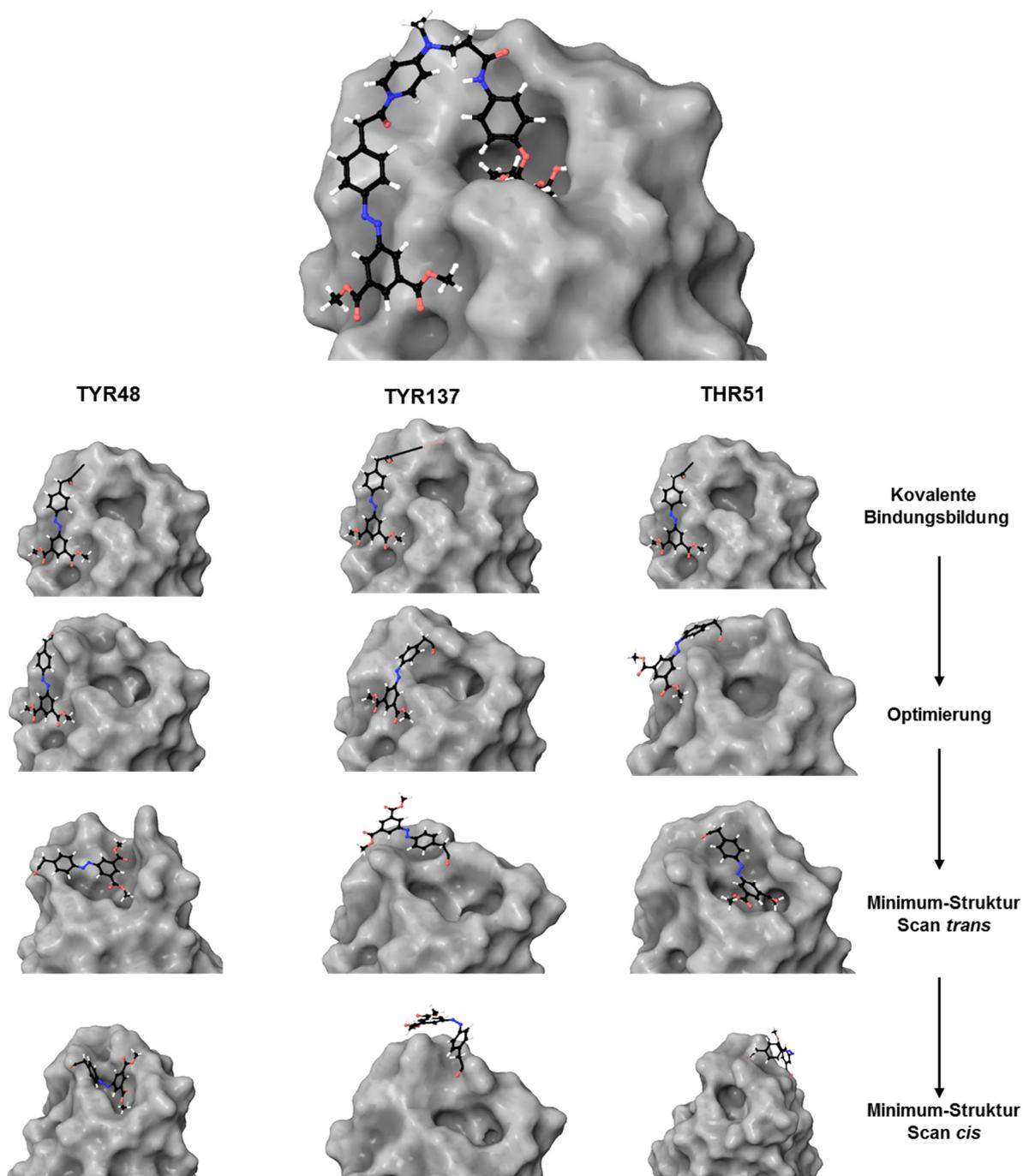


Abb. 133: Übersicht des Prozesses der kovalenten Bindungsbildung und Darstellung der Minimumstrukturen für die Bindung von **53** an TYR48, TYR137 und THR51 in der *closed gate*-Struktur.

Tab. 46: 53 closed gate-Struktur. Berechnete Energien nach Verstellung der Diederwinkel 1 und 2 in 30°-Schritten für die Bindung des Azobenzols an TYR48, TYR137 und THR51 in *trans*- und *cis*-Konfiguration.

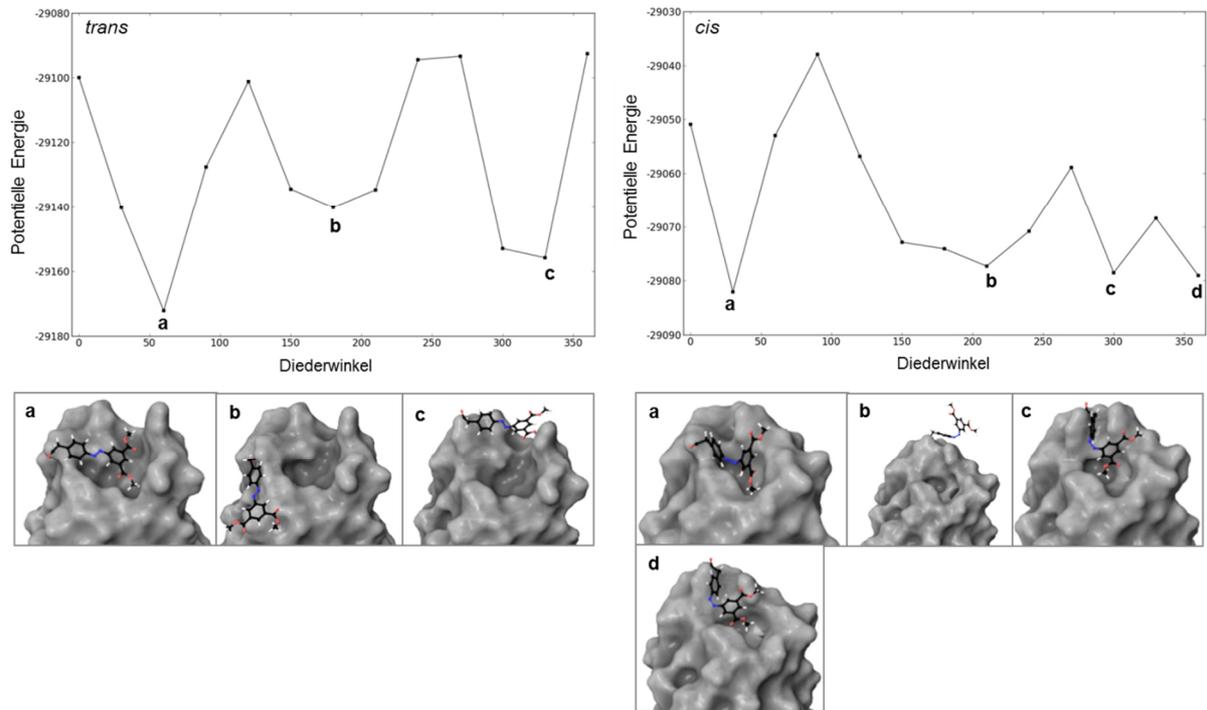
DW1	DW2	<i>trans</i> TYR48	<i>trans</i> TYR137	<i>trans</i> THR51	<i>cis</i> TYR48	<i>cis</i> TYR137	<i>cis</i> THR51
0	0	-29028,8	-29002,1	-29069,6	-28986,5	-28943,1	-29048,2
30	0	-29069,4	-29013,6	-29062,2	-28981,0	-28975,0	-29050,0
60	0	-29065,9	-29014,6	-29087,7	-29010,3	-28995,5	-29062,7
90	0	-29067,5	-29016,0	-29085,4	-29020,0	-28991,7	-29068,4
120	0	-29061,2	-29009,3	-29077,6	-29028,7	-28990,4	-29055,8
150	0	-29062,5	-29010,2	-29086,4	-29027,9	-28983,6	-29048,1
180	0	-29064,7	-29013,0	-29090,3	-29033,6	-28984,5	-29048,0
210	0	-29072,4	-29028,2	-29094,6	-29050,9	-28981,0	-29045,9
240	0	-29058,8	-29035,9	-29090,2	-29050,9	-28993,4	-29059,5
270	0	-29082,3	-29050,2	-29093,8	-29045,8	-28986,0	-29057,3
300	0	-29081,1	-29045,7	-29117,0	-29022,4	-29000,9	-29070,2
330	0	-29099,9	-29010,1	-29086,6	-29014,1	-28966,2	-29059,1
360	0	-29054,5	-29006,1	-29060,5	-29007,5	-28964,2	-29038,4
0	30	-29057,9	-29012,4	-29052,1	-29015,6	-28972,4	-29036,0
30	30	-29074,5	-29028,1	-29079,0	-29028,8	-28984,2	-29054,0
60	30	-29082,0	-29022,0	-29096,2	-29030,4	-28989,5	-29068,3
90	30	-29079,5	-29019,8	-29088,4	-29024,2	-28983,6	-29055,5
120	30	-29074,6	-29011,9	-29092,3	-29017,2	-28978,6	-29045,8
150	30	-29076,6	-29014,3	-29094,8	-29023,7	-28980,0	-29045,0
180	30	-29076,8	-29016,4	-29097,5	-29033,5	-28980,6	-29050,4
210	30	-29094,0	-29012,7	-29097,9	-29082,1	-28985,3	-29062,2
240	30	-17414,1	-29013,3	-29118,5	-29051,1	-28991,1	-29072,7
270	30	-29103,9	-29020,0	-29120,8	-29078,7	-29005,2	-29076,8
300	30	-29140,3	-29025,5	-29102,3	-29057,9	-28981,3	-29081,3
330	30	-28998,4	-29015,0	-29068,0	-29037,8	-28955,5	-29062,2
360	30	-29108,6	-29005,1	-29052,2	-29032,9	-28960,4	-29045,9
0	60	-29131,4	-29009,9	-29062,2	-29041,0	-28972,9	-29040,7
30	60	-29111,9	-29017,3	-29077,8	-29041,0	-28977,8	-29042,3
60	60	-29116,2	-29012,2	-29080,1	-29039,3	-28978,9	-29054,3
90	60	-29112,6	-29006,1	-29075,0	-29039,3	-28973,9	-29046,2
120	60	-29108,9	-29000,3	-29075,0	-29034,9	-28969,5	-29043,5
150	60	-29109,6	-29002,5	-29077,2	-29035,9	-28970,2	-29053,3
180	60	-29110,1	-29001,8	-29092,4	-29036,8	-28971,0	-29051,4
210	60	-29153,0	-29000,7	-29095,9	-29035,9	-28977,6	-29052,7
240	60	-29157,1	-29001,7	-29128,5	-29046,3	-28989,1	-29049,5
270	60	-29172,2	-29017,2	-29114,4	-29053,0	-28993,2	-29037,2
300	60	-29145,1	-29024,5	-29088,7	-29050,5	-28972,5	-29028,7
330	60	-29132,0	-29009,5	-29071,7	-29045,0	-28966,7	-29019,9

360	60	-29129,9	-29002,8	-29066,3	-29038,2	-28973,2	-29022,1
0	90	-29098,1	-28983,1	-29044,0	-29034,1	-28970,4	-29013,1
30	90	-29098,9	-28990,4	-29041,1	-29035,5	-28971,7	-29013,7
60	90	-29101,5	-28994,0	-29046,1	-29037,5	-28970,1	-29013,1
90	90	-29099,2	-28990,0	-29043,1	-29033,9	-28967,3	-29021,2
120	90	-29096,2	-28984,8	-29043,0	-29030,6	-28962,1	-29018,0
150	90	-29120,3	-28984,9	-29045,3	-29031,2	-28962,1	-29018,3
180	90	-29127,6	-28983,4	-29048,1	-29032,7	-28963,1	-29035,5
210	90	-29099,8	-28981,8	-29068,1	-29032,4	-28962,0	-29039,5
240	90	-29116,8	-28983,0	-29076,0	-29033,1	-28988,3	-28994,6
270	90	-29120,8	-28986,4	-29088,6	-29036,8	-28985,2	-28984,5
300	90	-29122,6	-29002,3	-29080,6	-29037,9	-28975,8	-29000,6
330	90	-29095,9	-29006,7	-29058,2	-29034,8	-28969,1	-28992,0
360	90	-29066,6	-28987,6	-29042,8	-29032,1	-28964,3	-28980,8
0	120	-29071,9	-28996,4	-29061,8	-29038,7	-28972,7	-29005,0
30	120	-29074,8	-29006,7	-29065,1	-29046,5	-28975,0	-29007,5
60	120	-29078,9	-29009,9	-29070,3	-29049,5	-28978,1	-29010,0
90	120	-29079,3	-28999,9	-29069,1	-29048,1	-28976,7	-29007,9
120	120	-29077,4	-28997,9	-29066,3	-29045,4	-28973,5	-29009,6
150	120	-29086,3	-29000,5	-29075,4	-29047,4	-28973,5	-29011,4
180	120	-29101,2	-28995,2	-29108,1	-29051,1	-28974,3	-29016,8
210	120	-29069,7	-28992,6	-29120,3	-29052,5	-28973,3	-29022,2
240	120	-29046,7	-28993,8	-29092,6	-29055,0	-28974,2	-22430,7
270	120	-29050,8	-28998,8	-29089,8	-29056,8	-28978,9	-29032,8
300	120	-29089,0	-28999,9	-29085,5	-29056,3	-28980,7	-29047,0
330	120	-29091,0	-28997,8	-29072,0	-29048,5	-28976,5	-29039,3
360	120	-29076,2	-28995,8	-29094,2	-29044,9	-28973,0	-29030,3
0	150	-29092,1	-29011,2	-29111,4	-29059,9	-28988,7	-29052,6
30	150	-29093,6	-29021,3	-29116,9	-29062,3	-28991,6	-29069,5
60	150	-29097,6	-29057,1	-29121,2	-29066,1	-28995,2	-29062,7
90	150	-29095,6	-29058,4	-29115,8	-29064,6	-28993,0	-29063,0
120	150	-29092,5	-29051,5	-29106,9	-29061,8	-28990,2	-29052,5
150	150	-29102,1	-29036,5	-29104,5	-29063,1	-28990,3	-29056,0
180	150	-29125,5	-29017,9	-29098,9	-29065,3	-28991,1	-29056,4
210	150	-29126,7	-29010,1	-29100,5	-29065,2	-28990,3	-29050,0
240	150	-29133,8	-29005,3	-29094,1	-29069,5	-28990,5	-29047,9
270	150	-29134,5	-29010,2	-29095,7	-29072,9	-28994,3	-29051,9
300	150	-29129,6	-29010,2	-29119,7	-29072,2	-28996,1	-29054,3
330	150	-29105,0	-29002,9	-29117,8	-29065,4	-28992,4	-29051,2
360	150	-29093,2	-28998,0	-29112,5	-29060,2	-28989,0	-29048,6
0	180	-29097,2	-28999,7	-29112,3	-29065,9	-28998,3	-29056,4
30	180	-29100,0	-29000,9	-29060,3	-29068,2	-29002,1	-29053,9
60	180	-29103,4	-29047,3	-29120,8	-29072,4	-29004,3	-29056,9
90	180	-29101,7	-29042,2	-29119,3	-29071,2	-28999,5	-29056,3

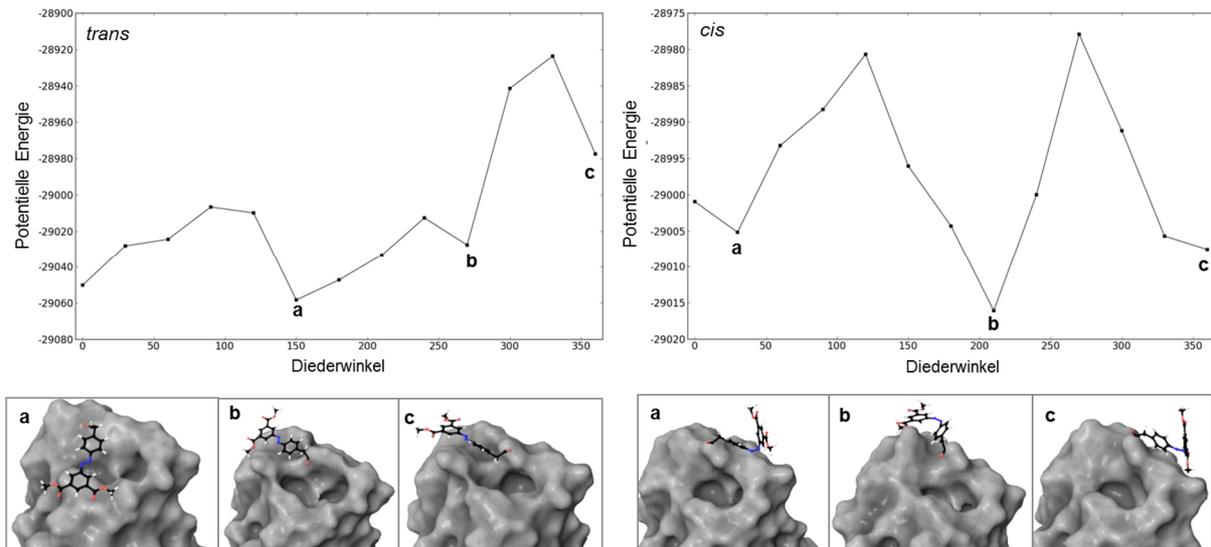
120	180	-29098,0	-29022,7	-29110,5	-29068,2	-28998,1	-29056,5
150	180	-29098,6	-29020,0	-29103,9	-29069,0	-29000,9	-29054,1
180	180	-29116,1	-29017,4	-29108,4	-29072,6	-29003,0	-29070,5
210	180	-29118,0	-29003,7	-29103,1	-29071,1	-29001,2	-29062,8
240	180	-29114,8	-29002,5	-29105,4	-29070,5	-28998,2	-29057,4
270	180	-29140,2	-29004,9	-29106,4	-29073,0	-28999,6	-29060,7
300	180	-29136,1	-29009,2	-29112,5	-29074,1	-29000,5	-29062,6
330	180	-29131,5	-29005,5	-29116,8	-29070,3	-28997,3	-29061,0
360	180	-29124,4	-28998,9	-29114,1	-29067,6	-28996,9	-29055,9
0	210	-29090,2	-28995,7	-29030,9	-29066,9	-29002,9	-29031,1
30	210	-29093,1	-28999,3	-29025,1	-29073,7	-29011,0	-29026,0
60	210	-29097,1	-29031,3	-29011,8	-29077,3	-29016,1	-29029,1
90	210	-29095,7	-29033,4	-29018,1	-29072,1	-29009,5	-29026,9
120	210	-29092,2	-29031,6	-29035,3	-29064,2	-28996,9	-29033,2
150	210	-29091,9	-29015,3	-29060,1	-29061,8	-28997,0	-29035,2
180	210	-29093,4	-29011,3	-29049,2	-29066,0	-28995,6	-29034,6
210	210	-29092,4	-29007,1	-29050,6	-29065,3	-28990,4	-29048,6
240	210	-29102,5	-28986,2	-29052,0	-29064,0	-28988,9	-29055,7
270	210	-29134,7	-28993,6	-29054,2	-29066,5	-28989,7	-29064,2
300	210	-29127,5	-28993,4	-29052,2	-29067,5	-28991,4	-29066,6
330	210	-29122,5	-28993,0	-29044,9	-29064,5	-28988,3	-29057,2
360	210	-29103,2	-28988,9	-29031,3	-29067,1	-28985,6	-29038,9
0	240	-29085,4	-28973,3	-28986,8	-29061,4	-28972,1	-29004,2
30	240	-29094,4	-28988,1	-28969,0	-29063,7	-28980,4	-29019,9
60	240	-29084,7	-28997,1	-28989,6	-29070,8	-29000,0	-29037,6
90	240	-29083,8	-28991,5	-28962,0	-29066,8	-28995,9	-29047,0
120	240	-29080,8	-29012,7	-28994,4	-29052,7	-28984,6	-29046,0
150	240	-29080,2	-29012,5	-28993,3	-29048,8	-28985,1	-29047,0
180	240	-29080,6	-29005,0	-29014,6	-29049,4	-28981,5	-29031,3
210	240	-29079,4	-28988,6	-29014,6	-29050,9	-28975,0	-29049,3
240	240	-29078,9	-28971,0	-29014,9	-29049,4	-28971,9	-29051,5
270	240	-29082,7	-28976,1	-29017,5	-29051,9	-28974,6	-29053,1
300	240	-29083,3	-28975,6	-29022,6	-29054,2	-28975,9	-29049,3
330	240	-29079,5	-28973,4	-29021,2	-29051,9	-28973,4	-29031,8
360	240	-29077,5	-28971,0	-29014,2	-29061,8	-28971,2	-29028,6
0	270	-29066,7	-28971,2	-28870,7	-29048,6	-28976,9	-29009,8
30	270	-29085,7	-28986,5	-28917,8	-29056,6	-28977,9	-29010,6
60	270	-29093,3	-28948,3	-28940,6	-29058,9	-28977,1	-29012,1
90	270	-29093,1	-28861,3	-28941,6	-29045,0	-28976,7	-29015,2
120	270	-29081,6	-28887,4	-28932,0	-29044,8	-28972,4	-29024,0
150	270	-29071,4	-28956,3	-28918,8	-29044,7	-28970,8	-29042,0
180	270	-29071,8	-28938,9	-28915,0	-29041,9	-28969,9	-29048,6
210	270	-29070,1	-28984,5	-28911,5	-29034,2	-28967,8	-29035,2

240	270	-29069,1	-28995,3	-28903,3	-29034,0	-28966,8	-29023,6
270	270	-29071,7	-29004,0	-28971,1	-29035,6	-28969,4	-29037,3
300	270	-29072,9	-29027,6	-28979,5	-29035,3	-28971,2	-29022,4
330	270	-29069,2	-28886,5	-19114,1	-29049,7	-28969,5	-29021,0
360	270	-29091,8	-28919,6	-28882,9	-29048,5	-28969,4	-29010,4
0	300	-29111,8	-28928,3	-28899,6	-29054,5	-28978,9	-29003,7
30	300	-29144,0	-28912,1	-28858,3	-29050,1	-28965,1	-28995,5
60	300	-29153,0	-28913,7	-28977,6	-29056,9	-28979,7	-29005,2
90	300	-29149,5	-28889,6	-28980,2	-29054,5	-28983,6	-29018,1
120	300	-29134,2	-28898,0	-28973,5	-29050,2	-28980,1	-29027,6
150	300	-29113,6	-28941,5	-28968,2	-29050,4	-28976,4	-29028,0
180	300	-29114,2	-28933,4	-28972,1	-29048,9	-28974,6	-29044,7
210	300	-29112,8	-28920,1	-28972,5	-29040,9	-28972,7	-29047,8
240	300	-29111,5	-28914,0	-28972,4	-29038,1	-28971,3	-29055,8
270	300	-29138,2	-28928,6	-29001,9	-29040,9	-28973,7	-29043,2
300	300	-29104,2	-28871,7	-28997,7	-29044,9	-28979,6	-29041,9
330	300	-17366,4	-28900,6	-29007,7	-29078,5	-28991,2	-29039,5
360	300	-29143,8	-28905,2	-28999,9	-29068,8	-28978,9	-29023,1
0	330	-29140,2	-28903,1	-28993,8	-29053,1	-28959,3	-29012,3
30	330	-29141,8	-28894,2	-17334,6	-29039,7	-28966,2	-29014,5
60	330	-22802,1	-28901,7	-22635,6	-29058,1	-28987,5	-29039,1
90	330	-29155,8	-28898,9	-28959,1	-29056,1	-28993,7	-29058,8
120	330	-29151,4	-28895,8	-28952,2	-29046,4	-28984,4	-29055,1
150	330	-29135,0	-28917,8	-28948,9	-29045,3	-28986,4	-29050,7
180	330	-29133,2	-28920,2	-28956,7	-29046,7	-28982,0	-29075,3
210	330	-29132,5	-28919,1	-28959,7	-29045,7	-28980,0	-29063,9
240	330	-29130,2	-28923,0	-17281,4	-29043,1	-28977,1	-29059,4
270	330	-29133,9	-28923,8	-21916,2	-29047,5	-28988,7	-29061,0
300	330	-29136,7	-28919,0	-29000,9	-29056,0	-29005,7	-29031,0
330	330	-29130,3	-28913,7	-28940,9	-29068,4	-28989,3	-29007,8
360	330	-29134,1	-28919,2	-28971,8	-29053,6	-28957,0	-28988,7
0	360	-29078,7	-28932,1	-28964,2	-21078,9	-28957,2	-28984,1
30	360	-29077,1	-28938,9	-28975,1	-29044,2	-28975,8	-28999,6
60	360	-29092,5	-28960,4	-28999,2	-29063,8	-28995,9	-29026,2
90	360	-29085,3	-28956,9	-28997,4	-29064,9	-28992,0	-29019,7
120	360	-29060,6	-28928,6	-28985,0	-29058,1	-28983,3	-29011,9
150	360	-29064,5	-28939,2	-28988,6	-29053,9	-28985,0	-29016,9
180	360	-29068,3	-28977,5	-28987,4	-29055,6	-28985,9	-29032,8
210	360	-29064,7	-28970,6	-28980,4	-29053,2	-28981,7	-29029,0
240	360	-29063,1	-28967,0	-28987,9	-29056,4	-28993,9	-29025,5
270	360	-29066,9	-22678,4	-29001,1	-29071,5	-29007,5	-29023,0
300	360	-29063,4	-28960,5	-28986,7	-29079,0	-29001,8	-29012,6
330	360	-29058,8	-28928,1	-28962,6	-29075,6	-28966,9	-28980,6
360	360	-29072,0	-28883,1	-28942,6	-29046,7	-28957,6	-28989,4

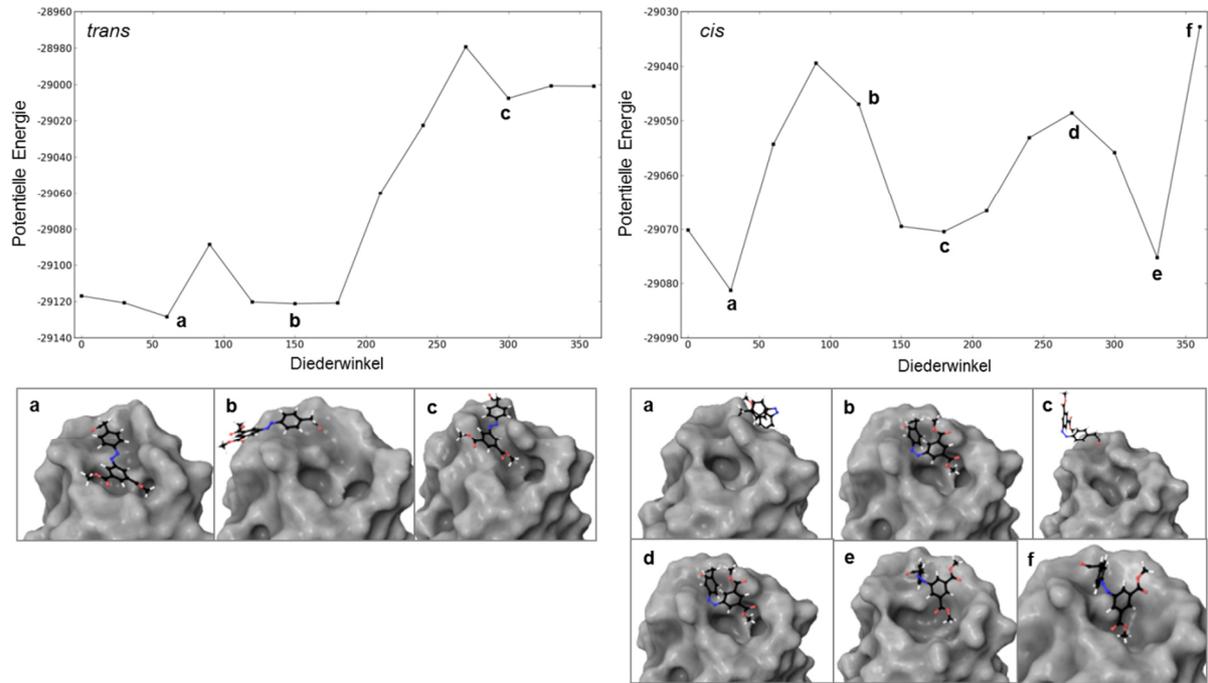
TYR48 *closed gate*-Struktur



TYR137 *closed gate*-Struktur



THR51 closed *gate*-Struktur



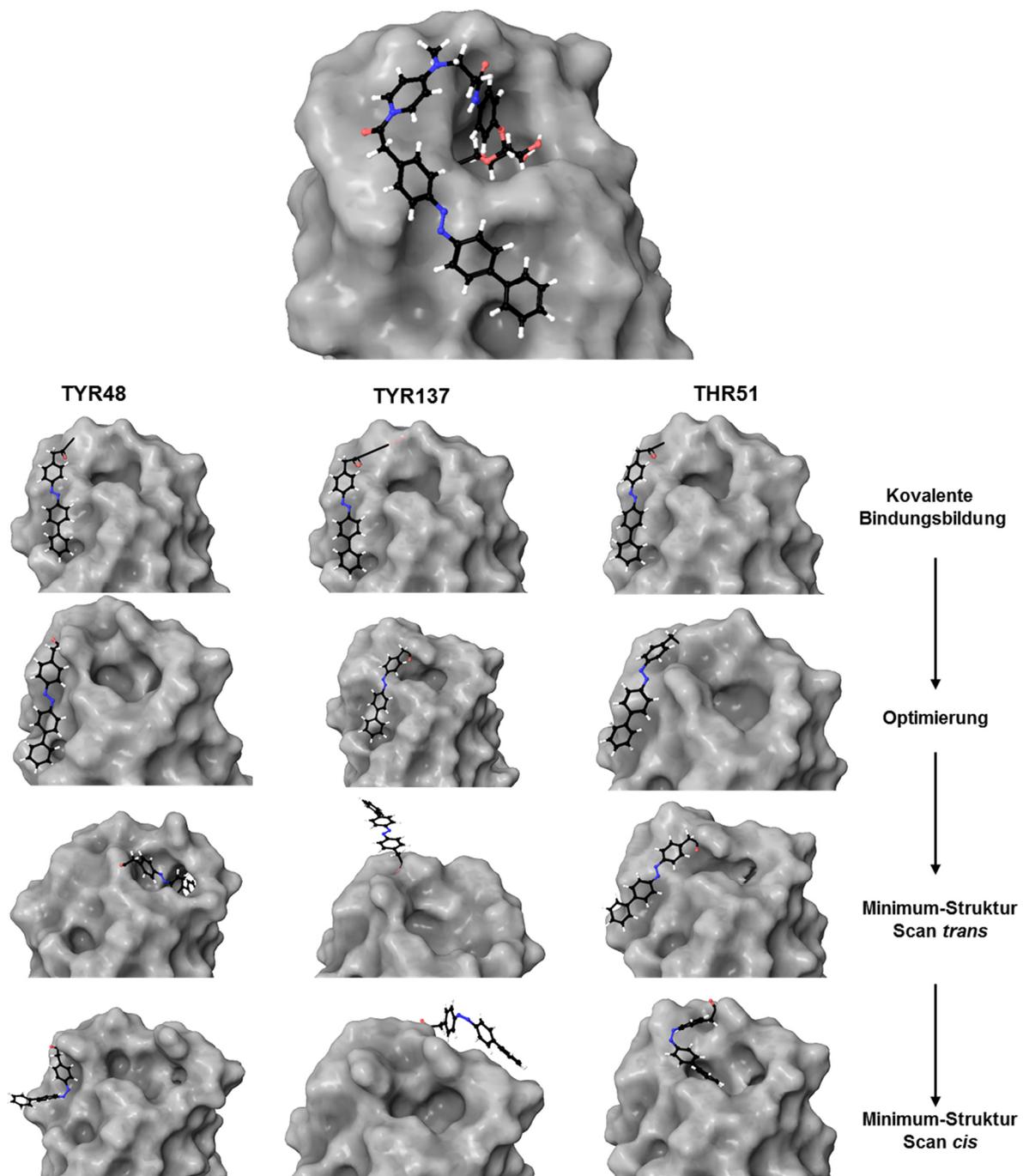


Abb. 134: Übersicht des Prozesses der kovalenten Bindungsbildung und Darstellung der Minimumstrukturen für die Bindung von **54** an TYR48, TYR137 und THR51 in der *open gate*-Struktur.

Tab. 47: 54 open gate-Struktur. Berechnete Energien nach Verstellung der Diederwinkel 1 und 2 in 30°-Schritten für die Bindung des Azobenzols an TYR48, TYR137 und THR51 in *trans*- und *cis*-Konfiguration.

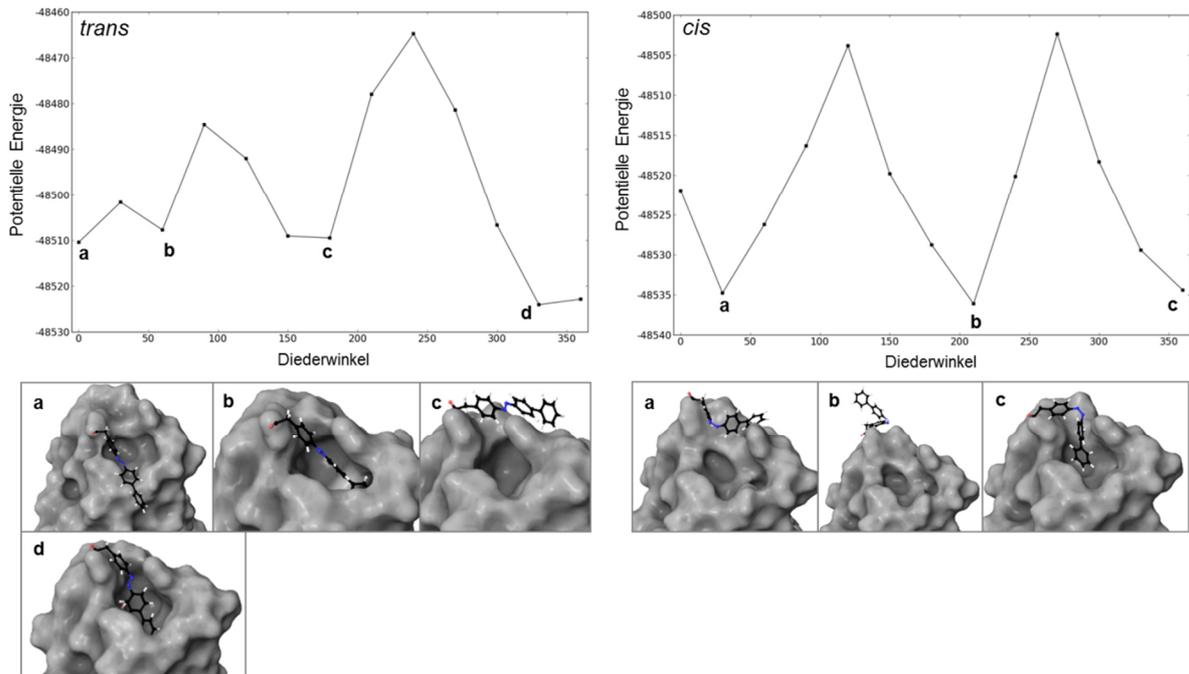
DW1	DW2	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>
		TYR48	TYR137	THR51	TYR48	TYR137	THR51
0	0	-48355,3	-48495,2	-48552,1	-48198,0	-48236,8	-48363,3
30	0	-48495,8	-48550,1	-48556,1	-40981,4	-48251,3	-48380,4
60	0	-48508,7	-48569,5	-48574,3	-48521,9	-48321,2	-48401,1
90	0	-48495,7	-48571,6	-48571,7	-48516,0	-48322,2	-48396,8
120	0	-48489,8	-48573,0	-48563,2	-48511,2	-48315,0	-48387,9
150	0	-48491,2	-48576,5	-48563,6	-48508,5	-48308,7	-48389,4
180	0	-48493,8	-48579,1	-48568,7	-48510,5	-48354,8	-48395,1
210	0	-48489,1	-48573,4	-48566,6	-48506,3	-48344,1	-48392,0
240	0	-48510,5	-48593,0	-48562,0	-48504,5	-48379,2	-48388,1
270	0	-48503,2	-48600,4	-48562,4	-48513,4	-42121,9	-48387,7
300	0	-39198,7	-48592,8	-48558,9	-48505,0	-48373,8	-48383,9
330	0	-48476,1	-48423,4	-48530,8	-48482,2	-48325,0	-48356,0
360	0	-48394,9	-48530,5	-48513,7	-48489,0	-48173,6	-48365,0
0	30	-38919,9	-48438,3	-48548,9	-48495,1	-48181,2	-48373,1
30	30	-48468,0	-48497,8	-48565,3	-48512,5	-48246,9	-48391,2
60	30	-48479,8	-48543,3	-48569,4	-48515,1	-48256,3	-48397,8
90	30	-48471,4	-48552,8	-48564,2	-48513,1	-48247,5	-48389,2
120	30	-48472,1	-48534,1	-48556,7	-48504,6	-48241,7	-48382,6
150	30	-48474,2	-48539,4	-48562,2	-48505,3	-48270,7	-48388,3
180	30	-48474,0	-48534,0	-48565,1	-48506,0	-48288,1	-48390,8
210	30	-48470,7	-48523,5	-48561,5	-48502,3	-48294,4	-48387,2
240	30	-48501,7	-48524,0	-48552,4	-48508,6	-48286,7	-48383,0
270	30	-48476,3	-48532,3	-48557,2	-48534,8	-40754,2	-48394,4
300	30	-48485,7	-48531,1	-48555,1	-48523,6	-41827,6	-48390,8
330	30	-48351,3	-48516,3	-48560,9	-48499,5	-40766,4	-48372,0
360	30	-48447,9	-48514,1	-48571,5	-48495,8	-38919,6	-48373,3
0	60	-48466,9	-48509,6	-48571,3	-48501,3	-48396,3	-48377,0
30	60	-48455,2	-48518,6	-48573,6	-48502,0	-48432,4	-48385,9
60	60	-48458,7	-48511,0	-48573,5	-48507,6	-48436,6	-48382,1
90	60	-48455,0	-48506,5	-48567,8	-48503,2	-48415,0	-48376,9
120	60	-48451,2	-48503,4	-48566,7	-48496,0	-48411,6	-48375,4
150	60	-48452,1	-48505,0	-48568,4	-48495,9	-48413,5	-48377,2
180	60	-48452,9	-48506,4	-48568,0	-48497,3	-48415,6	-48376,9
210	60	-48451,3	-48506,4	-48568,5	-48496,3	-48412,7	-48377,4
240	60	-48455,3	-48508,1	-48573,1	-48526,2	-48416,3	-48380,7
270	60	-48507,8	-48511,5	-48583,7	-48526,2	-48427,3	-48387,2
300	60	-48494,5	-48523,4	-48575,7	-48514,3	-48456,0	-48383,6
330	60	-41478,1	-48519,7	-48575,4	-48501,3	-48435,6	-48376,4
360	60	-48471,4	-48509,6	-48564,1	-48501,5	-48439,5	-48376,6

0	90	-48451,0	-48502,5	-48564,8	-48493,5	-48450,3	-48377,3
30	90	-48451,4	-48503,7	-48569,3	-48496,1	-48457,5	-48379,0
60	90	-48453,8	-48504,3	-48566,7	-48497,4	-48442,9	-48379,9
90	90	-48451,1	-48511,7	-48563,4	-48491,8	-48467,1	-48372,5
120	90	-48447,7	-48516,8	-48559,9	-48487,4	-48442,3	-48368,9
150	90	-48448,3	-48515,0	-48560,7	-48487,8	-48463,9	-48369,8
180	90	-48449,2	-48508,6	-48562,3	-48488,9	-48470,6	-48371,7
210	90	-48448,6	-48503,3	-48562,9	-48488,6	-48466,2	-48372,1
240	90	-48458,5	-48502,0	-48565,4	-48492,2	-48466,4	-48373,9
270	90	-48482,9	-48504,3	-48577,0	-48516,3	-48469,6	-48382,2
300	90	-48484,6	-48529,1	-48580,2	-48509,8	-48460,8	-48387,1
330	90	-48477,3	-48520,6	-48574,4	-48502,2	-48456,5	-48378,3
360	90	-48454,4	-48508,9	-48562,4	-48489,6	-48456,4	-48377,5
0	120	-48455,4	-48533,4	-48584,4	-48498,1	-48471,9	-48393,8
30	120	-48458,5	-48527,4	-48599,8	-48500,3	-48464,5	-48404,6
60	120	-48462,6	-48545,3	-48609,8	-48501,6	-48470,0	-48406,4
90	120	-48461,1	-48540,8	-48600,2	-48500,9	-48460,7	-48402,2
120	120	-48458,6	-48526,7	-48577,5	-48498,1	-48464,3	-48397,5
150	120	-48458,7	-48529,4	-48577,5	-48498,7	-48459,1	-48387,3
180	120	-48461,2	-48529,5	-48578,4	-48499,8	-48462,1	-48388,7
210	120	-48488,4	-48527,5	-48577,6	-48499,4	-48478,7	-48387,8
240	120	-48491,6	-48526,2	-48578,7	-48499,9	-48460,6	-48389,6
270	120	-48492,0	-48528,9	-48583,6	-48503,2	-48450,8	-48394,8
300	120	-48477,7	-48555,8	-48587,7	-48503,8	-48452,0	-48398,4
330	120	-48479,6	-48550,9	-48586,6	-48499,6	-48447,5	-48396,8
360	120	-48458,4	-48564,6	-48589,8	-48496,6	-48455,6	-48393,9
0	150	-48471,4	-36834,8	-48620,4	-48512,1	-48467,6	-48426,9
30	150	-48474,8	-39112,1	-48627,5	-48515,4	-48467,9	-48431,9
60	150	-48478,7	-48382,7	-48625,7	-48519,3	-48470,5	-48430,9
90	150	-48477,5	-36653,7	-48625,1	-48517,6	-48469,5	-48429,4
120	150	-48475,8	-48440,8	-48610,1	-48514,4	-48467,0	-48437,0
150	150	-48476,4	-48529,4	-48601,4	-48514,7	-48489,3	-48431,6
180	150	-48500,4	-48526,5	-48601,8	-48515,8	-48497,1	-48412,7
210	150	-48495,6	-48519,0	-48600,7	-48515,0	-48485,3	-48411,9
240	150	-48503,8	-48513,5	-48601,0	-48515,4	-48484,1	-48412,6
270	150	-48509,1	-48525,1	-48605,4	-48518,7	-48479,5	-48416,9
300	150	-48506,1	-48528,7	-48611,6	-48519,8	-48479,7	-48419,7
330	150	-48480,0	-48521,7	-48617,9	-48515,5	-48472,4	-48420,3
360	150	-48472,9	-48518,9	-48639,8	-48512,3	-48467,4	-48426,8
0	180	-48477,8	-48524,5	-48650,8	-48520,0	-48468,5	-48440,0
30	180	-48481,0	-48526,1	-48649,6	-48524,2	-48471,2	-48437,8
60	180	-48485,4	-48524,9	-48656,1	-48528,8	-48475,7	-48440,9
90	180	-48483,8	-48530,9	-48655,8	-48526,5	-48477,7	-48442,1

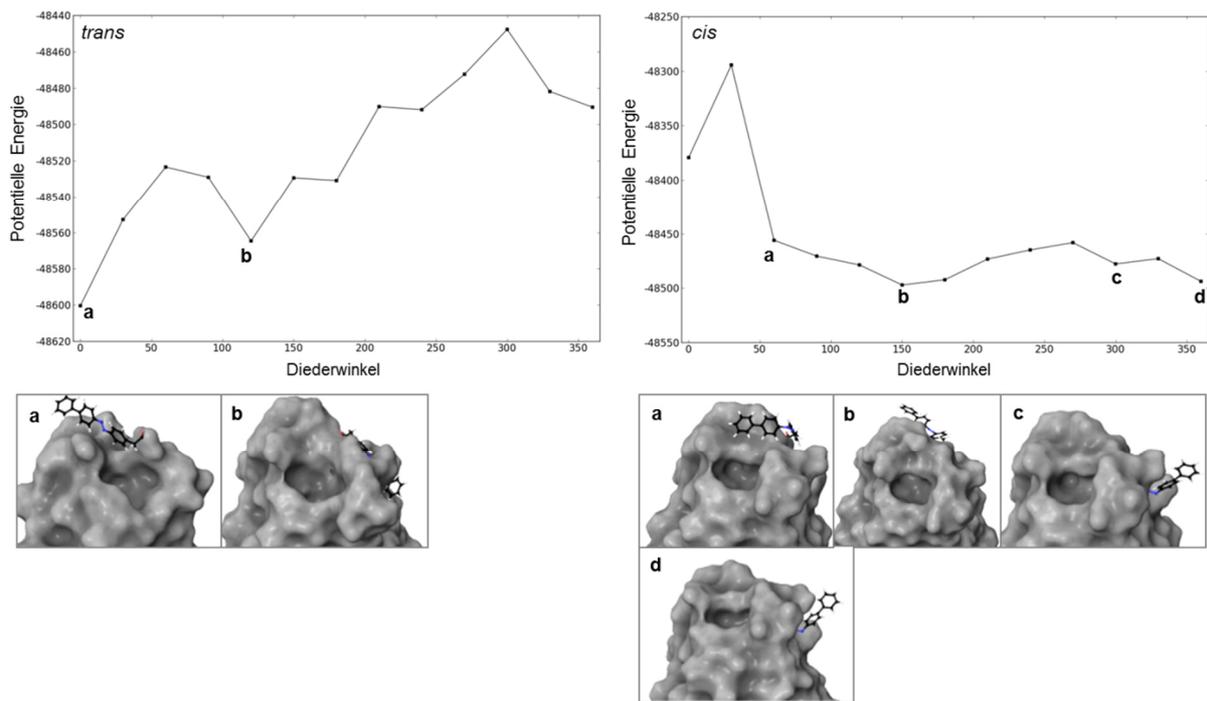
120	180	-48480,3	-42096,1	-48645,5	-48522,2	-48475,3	-48449,5
150	180	-48480,5	-48434,8	-48631,5	-48521,7	-48474,3	-48442,8
180	180	-48482,0	-48363,5	-48631,1	-48522,6	-48476,5	-48423,2
210	180	-48505,5	-48449,4	-48629,7	-48521,5	-48492,4	-48422,4
240	180	-48502,7	-48507,3	-48629,7	-48521,4	-48491,9	-48422,6
270	180	-48509,5	-48511,2	-48633,7	-48524,4	-48486,9	-48427,2
300	180	-48490,6	-48500,0	-48638,0	-48525,8	-48483,3	-48443,0
330	180	-48484,3	-48484,7	-48645,1	-48522,2	-48475,8	-48440,9
360	180	-48479,0	-48472,4	-48674,7	-48519,9	-48469,6	-48440,3
0	210	-48471,9	-48475,2	-41197,1	-48522,6	-48460,1	-48426,4
30	210	-48475,5	-48486,2	-48652,1	-48530,4	-48463,2	-48424,2
60	210	-48479,2	-48472,4	-48652,9	-48536,1	-48471,2	-48441,0
90	210	-48477,9	-36766,2	-48646,8	-48534,2	-48473,4	-48436,2
120	210	-48474,3	-48480,5	-48643,5	-48530,3	-48468,2	-48418,0
150	210	-48474,1	-48474,4	-48640,3	-48523,6	-48464,7	-48411,3
180	210	-48474,9	-48482,0	-48640,2	-48520,6	-48466,1	-48412,0
210	210	-48473,7	-48490,2	-48639,4	-48517,4	-48464,6	-48411,0
240	210	-48473,2	-48480,8	-48640,8	-48516,3	-48466,0	-48411,2
270	210	-48476,3	-48481,9	-48645,6	-48519,3	-48467,4	-48418,5
300	210	-48478,0	-48478,0	-48663,5	-48520,7	-48467,4	-48426,3
330	210	-48474,6	-37789,5	-39093,7	-48517,7	-48462,2	-48433,4
360	210	-48472,2	-41999,1	-48655,5	-48517,1	-48458,9	-48425,9
0	240	-48457,5	-48460,6	-48640,9	-48509,6	-48447,3	-48396,7
30	240	-48460,0	-48459,0	-48640,4	-48509,2	-48458,4	-48416,7
60	240	-48464,8	-48468,1	-48633,0	-48510,7	-48464,9	-48417,1
90	240	-48461,6	-48472,5	-48624,8	-48520,1	-48462,3	-48414,9
120	240	-48457,5	-48491,9	-48618,1	-48516,1	-48459,2	-48398,5
150	240	-48458,1	-48472,7	-48617,0	-48512,3	-48459,3	-48388,6
180	240	-48459,4	-48441,1	-48616,7	-48511,1	-48455,2	-48389,2
210	240	-48458,8	-36705,8	-48615,4	-48506,3	-48451,6	-48388,0
240	240	-48458,4	-42046,3	-48616,9	-48503,9	-48451,1	-48388,0
270	240	-48461,4	-40837,3	-48628,4	-48506,1	-48453,2	-48394,1
300	240	-48462,8	-40718,3	-48646,3	-48507,5	-48453,0	-48412,3
330	240	-48460,2	-48402,2	-48644,4	-48506,2	-48456,1	-48406,5
360	240	-48457,3	-48444,5	-48608,3	-48506,5	-48453,3	-48406,9
0	270	-48444,6	-48436,8	-41066,0	-48501,3	-48440,2	-48390,5
30	270	-48472,3	-48440,5	-48599,3	-48500,4	-48446,8	-48380,8
60	270	-48481,2	-48434,4	-48599,0	-48502,4	-48448,8	-48382,9
90	270	-48481,4	-48464,9	-48599,6	-48500,0	-48442,4	-48383,1
120	270	-48455,1	-48460,3	-48598,0	-48498,5	-48444,0	-48369,5
150	270	-48451,6	-48448,8	-48599,3	-48496,0	-48458,2	-48367,8
180	270	-48451,8	-48472,4	-48598,9	-48494,5	-48450,5	-48370,5
210	270	-48450,3	-48447,6	-48598,0	-48491,4	-48443,4	-48370,3
240	270	-48449,4	-48447,4	-48597,1	-48490,1	-48439,7	-48369,1

270	270	-48452,6	-48455,6	-48602,1	-48493,1	-48440,7	-48374,2
300	270	-48454,5	-48449,2	-48617,4	-48495,5	-48443,8	-48381,9
330	270	-48451,1	-48452,3	-48625,4	-48493,5	-48441,1	-48385,6
360	270	-48474,2	-48449,5	-48614,1	-48490,7	-48445,8	-48390,9
0	300	-48460,5	-48446,5	-48593,9	-48513,4	-48444,5	-48359,9
30	300	-48506,7	-48443,3	-48587,6	-48507,7	-48447,4	-48362,1
60	300	-41522,5	-48446,3	-48602,1	-48516,9	-48448,3	-48378,0
90	300	-48480,6	-48447,8	-48607,6	-48512,4	-48456,8	-48383,4
120	300	-48473,4	-48444,2	-48604,9	-48504,3	-48455,9	-48378,5
150	300	-48466,6	-48431,8	-48601,8	-48501,2	-48477,8	-48375,8
180	300	-48466,4	-48431,9	-48601,9	-48501,7	-48463,8	-48376,7
210	300	-48465,4	-48431,1	-48601,2	-48500,0	-48452,9	-48376,4
240	300	-48463,9	-48430,3	-48600,4	-48499,1	-48448,9	-48376,1
270	300	-48467,2	-48434,9	-48603,8	-48505,1	-48452,2	-48380,2
300	300	-48469,3	-48438,7	-48606,0	-48518,3	-48459,8	-48390,9
330	300	-48473,4	-48434,5	-48616,4	-48514,7	-48460,4	-48393,1
360	300	-48494,0	-48444,7	-48593,6	-48511,9	-48452,9	-48363,4
0	330	-48470,7	-48439,9	-48555,6	-48508,5	-48429,0	-48361,0
30	330	-41494,2	-48434,1	-48593,1	-48505,1	-48421,9	-48368,3
60	330	-48464,1	-48451,4	-48612,8	-48518,0	-48438,4	-48392,3
90	330	-48478,0	-48456,7	-48620,4	-48516,8	-48447,5	-48395,4
120	330	-48464,3	-48441,9	-48615,4	-48511,5	-48472,9	-48388,2
150	330	-48461,6	-48447,1	-48611,3	-48508,8	-48468,0	-48385,6
180	330	-48464,6	-48448,7	-48615,1	-48511,7	-48462,3	-48389,9
210	330	-48463,0	-48447,2	-48614,8	-48510,0	-48455,2	-48389,2
240	330	-48459,7	-48447,7	-48612,6	-48509,1	-48452,2	-48387,4
270	330	-48462,5	-48481,2	-48612,6	-48512,9	-48463,4	-48388,4
300	330	-48488,1	-48481,9	-48628,0	-48529,4	-48464,4	-48388,8
330	330	-48524,1	-48474,0	-48609,8	-48523,8	-48444,1	-48370,7
360	330	-48438,3	-48440,5	-48581,2	-48508,7	-48428,9	-48359,4
0	360	-48427,3	-48436,3	-48590,2	-48498,2	-48416,2	-48365,2
30	360	-40823,4	-48448,4	-48617,8	-48507,6	-48425,6	-48383,2
60	360	-48473,5	-48458,5	-48631,1	-48518,2	-48442,6	-48403,7
90	360	-48462,6	-48459,1	-48625,8	-48518,3	-48449,3	-48394,0
120	360	-48459,5	-48453,0	-48616,4	-48510,9	-48493,8	-48389,8
150	360	-48460,6	-48454,1	-48616,8	-48511,8	-48481,6	-48391,0
180	360	-48464,6	-48458,4	-48622,0	-48515,0	-48476,6	-48397,1
210	360	-48456,2	-48481,5	-48619,4	-48520,4	-48466,6	-48394,1
240	360	-48508,1	-48490,6	-48614,1	-48528,5	-48470,2	-48388,2
270	360	-48487,5	-48486,1	-48613,4	-48522,0	-48462,4	-48396,0
300	360	-48522,9	-48479,4	-48610,0	-48534,4	-48472,3	-48393,9
330	360	-48511,6	-48466,8	-48609,2	-48452,2	-48452,5	-48378,1
360	360	-48507,6	-48453,6	-48592,9	-48424,4	-48418,0	-48365,4

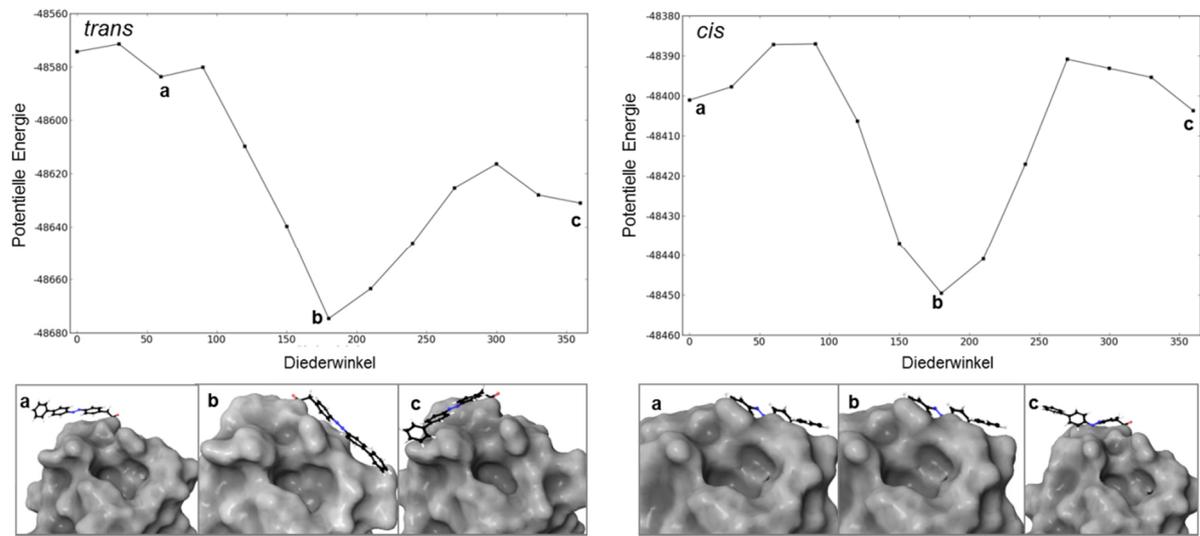
TYR48 *open gate*-Struktur



TYR137 *open gate*-Struktur



THR51 *open gate*-Struktur



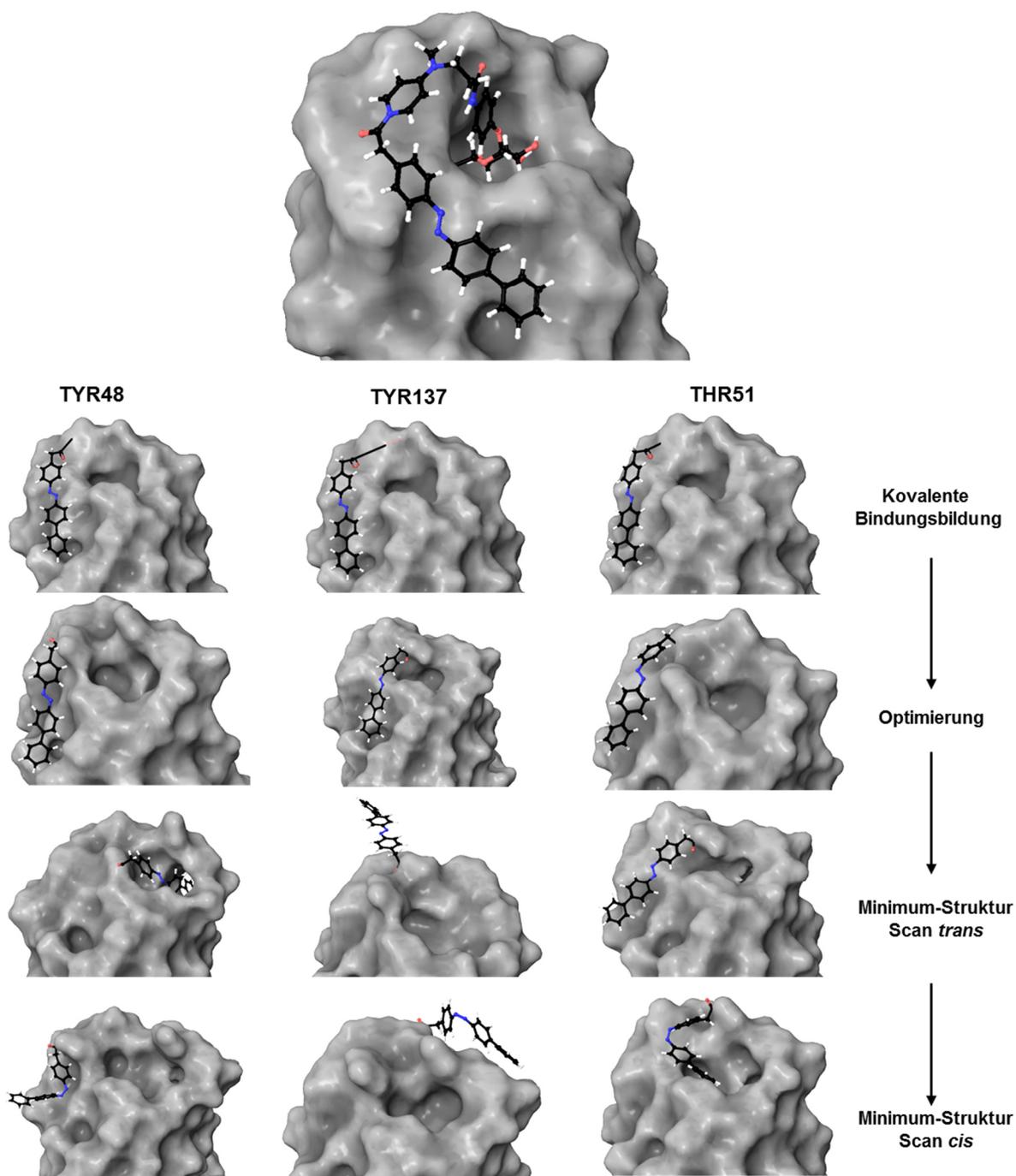


Abb. 135: Übersicht des Prozesses der kovalenten Bindungsbildung und Darstellung der Minimumstrukturen für die Bindung von **54** an TYR48, TYR137 und THR51 in der *closed gate*-Struktur.

Tab. 48: 54 *closed gate*-Struktur. Berechnete Energien nach Verstellung der Diederwinkel 1 und 2 in 30°- Schritten für die Bindung des Azobenzols an TYR48, TYR137 und THR51 in *trans*- und *cis*-Konfiguration.

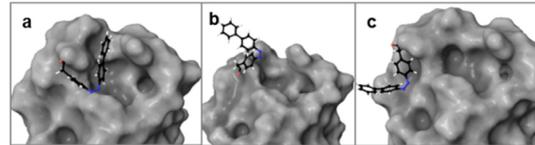
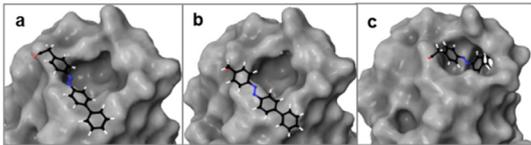
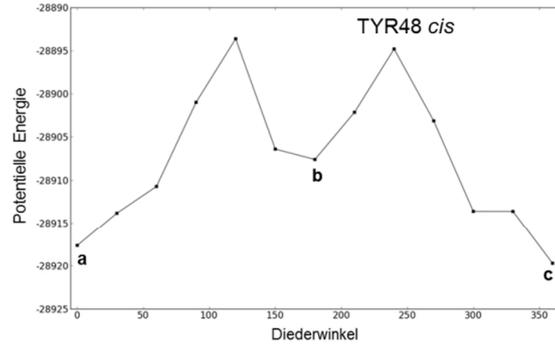
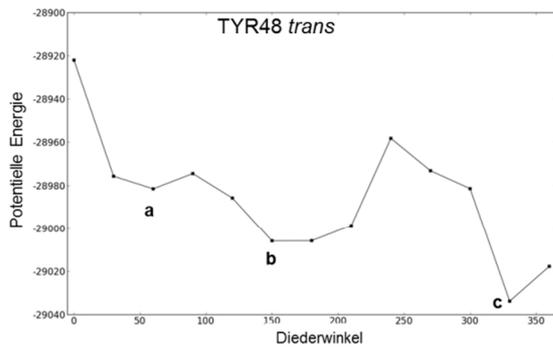
DW1	DW2	<i>trans</i> TYR48	<i>trans</i> TYR137	<i>trans</i> THR51	<i>cis</i> TYR48	<i>cis</i> TYR137	<i>cis</i> THR51
0	0	-28827,1	-19437,2	-28961,0	-28706,1	-19339,4	-28975,1
30	0	-22415,3	-28934,2	-28984,2	-21341,0	-28871,4	-28984,3
60	0	-28894,8	-28941,6	-29008,6	-28902,3	-28919,9	-28993,1
90	0	-28890,0	-28941,9	-29018,2	-28917,7	-28922,4	-28997,8
120	0	-28883,2	-28935,7	-29007,9	-28893,9	-28907,9	-28977,9
150	0	-28885,1	-28937,1	-29012,8	-28914,9	-28907,8	-28981,1
180	0	-28888,1	-28940,0	-29026,6	-28913,8	-28915,7	-28980,3
210	0	-28884,2	-28936,8	-29010,2	-28894,0	-28909,8	-28988,6
240	0	-28881,9	-28959,9	-29036,5	-28895,4	-28904,4	-28991,9
270	0	-28926,1	-28964,2	-29044,6	-28896,2	-28941,2	-28977,5
300	0	-28950,0	-28954,0	-29033,2	-28891,7	-28930,0	-28965,2
330	0	-22612,8	-28921,8	-28998,5	-28852,5	-28897,1	-28933,3
360	0	-28922,0	-28926,2	-28980,0	-18120,4	-28855,4	-28924,3
0	30	-28923,1	-28933,5	-28982,0	-28795,7	-28856,5	-28958,3
30	30	-28946,0	-28946,6	-29004,7	-28810,2	-28894,7	-28966,9
60	30	-28973,2	-28948,2	-29017,2	-28815,1	-28916,2	-28988,0
90	30	-28967,4	-28946,1	-29007,6	-28910,2	-28922,7	-28977,4
120	30	-28958,7	-28938,0	-29006,9	-28900,9	-28903,3	-28973,9
150	30	-28960,5	-28940,4	-29009,5	-28900,4	-28944,1	-28968,1
180	30	-28961,4	-28942,2	-29009,6	-28913,9	-28943,8	-28969,6
210	30	-28960,0	-28938,4	-29010,7	-28910,7	-28934,2	-28963,8
240	30	-28960,3	-28940,1	-29039,7	-28893,6	-28939,7	-28982,5
270	30	-28975,7	-28943,3	-29039,9	-28878,2	-28928,0	-28973,1
300	30	-28964,4	-28949,4	-29015,7	-28856,2	-28923,9	-28948,1
330	30	-28948,2	-22518,3	-28987,8	-28832,2	-28901,7	-28972,4
360	30	-28949,3	-28923,0	-28982,1	-28849,0	-28897,6	-28964,1
0	60	-28964,8	-28930,4	-28987,6	-28866,6	-28905,9	-28962,7
30	60	-28974,2	-28931,9	-29000,7	-28875,2	-28917,6	-28960,9
60	60	-28964,7	-28931,5	-29007,5	-28879,0	-28931,9	-28969,4
90	60	-28956,0	-28925,5	-29008,3	-28873,4	-28929,8	-28964,5
120	60	-28952,1	-28920,6	-29003,4	-28870,4	-28916,9	-28958,3
150	60	-28952,9	-28927,6	-29001,8	-28869,3	-28910,4	-28951,3
180	60	-28953,9	-28925,3	-28999,0	-28888,2	-28899,7	-28964,9
210	60	-28953,1	-28925,5	-29019,6	-28900,7	-28899,0	-28957,8
240	60	-28981,6	-28926,7	-29027,8	-28901,1	-28899,8	-28967,7
270	60	-28959,7	-28936,5	-29021,0	-28910,7	-28908,6	-28953,6
300	60	-28960,5	-28949,1	-29001,7	-28903,2	-28906,1	-28944,3
330	60	-21901,2	-28937,3	-28983,4	-28892,2	-28897,7	-28957,9

360	60	-28955,6	-28937,3	-28987,4	-28888,7	-28901,5	-28940,4
0	90	-28965,8	-28926,1	-28994,9	-28874,1	-28897,6	-28944,4
30	90	-28951,5	-28932,3	-28999,3	-28875,7	-28898,5	-28959,1
60	90	-28948,1	-28934,1	-29002,0	-28877,0	-28897,2	-28963,1
90	90	-28945,5	-28930,7	-29002,0	-28874,1	-28893,9	-28950,4
120	90	-28942,7	-28926,9	-28997,8	-28870,4	-28888,7	-28951,1
150	90	-28943,2	-28926,9	-28998,0	-28870,5	-28888,8	-28944,8
180	90	-28944,7	-28928,3	-28998,1	-28870,5	-28889,8	-28951,7
210	90	-28944,5	-28927,0	-28994,6	-28873,2	-28888,8	-28951,4
240	90	-28974,5	-28928,1	-28995,4	-28873,9	-28899,7	-28947,5
270	90	-28957,4	-28931,5	-28998,3	-28901,0	-28904,1	-28929,7
300	90	-28961,5	-28933,2	-28998,4	-28896,9	-28902,1	-28942,5
330	90	-28953,6	-28928,1	-28994,1	-28885,7	-28895,4	-28954,9
360	90	-28965,7	-28926,8	-28994,7	-28875,8	-28890,8	-28955,6
0	120	-28953,0	-28941,6	-29023,1	-28879,3	-28899,3	-28966,7
30	120	-28952,1	-28942,0	-29022,1	-28881,9	-28901,5	-28979,2
60	120	-28955,9	-28942,3	-29022,2	-28885,5	-28904,3	-28974,2
90	120	-28954,6	-28936,5	-29016,5	-28884,1	-28903,0	-28956,9
120	120	-28951,7	-28931,3	-29009,3	-28880,9	-28899,7	-28967,8
150	120	-28952,2	-28932,5	-28999,5	-28881,1	-28899,8	-28965,0
180	120	-28954,0	-28937,6	-29014,6	-28882,9	-28900,6	-28966,2
210	120	-28981,3	-28939,8	-29013,4	-28889,2	-28900,0	-28969,9
240	120	-28985,2	-28939,3	-29015,6	-28891,3	-28901,2	-28968,9
270	120	-28985,9	-28945,1	-29020,0	-28893,6	-28905,5	-28968,1
300	120	-28983,1	-28946,2	-29024,9	-28891,9	-28907,0	-28974,5
330	120	-28979,2	-28944,0	-29028,2	-28887,6	-28902,5	-28976,1
360	120	-28973,5	-28941,4	-29023,4	-28881,3	-28899,4	-28973,1
0	150	-28966,5	-28952,2	-29041,3	-28894,6	-28915,4	-29002,5
30	150	-28971,6	-28947,1	-29037,2	-28896,8	-28918,3	-29008,3
60	150	-28976,8	-28950,2	-29036,8	-28901,0	-28921,7	-29010,4
90	150	-28974,9	-28952,1	-29032,0	-28899,2	-28919,6	-29007,1
120	150	-28972,4	-28957,4	-29024,7	-28895,6	-28918,4	-28999,3
150	150	-28972,6	-28956,8	-29030,8	-28895,8	-28918,0	-28991,9
180	150	-28971,4	-28957,6	-29033,6	-28898,0	-28917,4	-28992,1
210	150	-28995,2	-28956,8	-29032,7	-28900,8	-28915,9	-28990,5
240	150	-28996,3	-28956,9	-29031,0	-28903,0	-28917,3	-28990,7
270	150	-29006,0	-28960,3	-29033,0	-28906,4	-28921,0	-28995,2
300	150	-28991,3	-28962,1	-29034,2	-28905,7	-28922,4	-28998,9
330	150	-28973,2	-28958,6	-29029,3	-28899,0	-28918,5	-29001,5
360	150	-28969,4	-28955,5	-29025,4	-28894,1	-28915,3	-29002,3
0	180	-28973,1	-28965,7	-29035,8	-28900,9	-28924,8	-29017,2
30	180	-28976,4	-28969,2	-29037,3	-28903,7	-28928,4	-29019,7
60	180	-28980,7	-28971,3	-29042,2	-28907,5	-28930,6	-29023,6
90	180	-28978,7	-28967,3	-29044,9	-28906,2	-28926,5	-29021,7

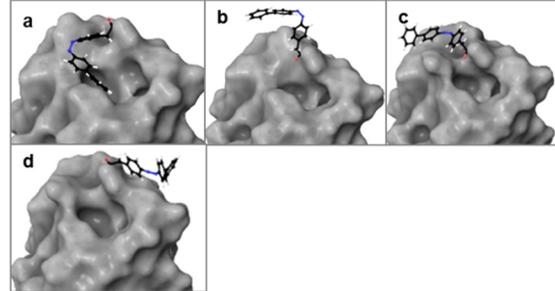
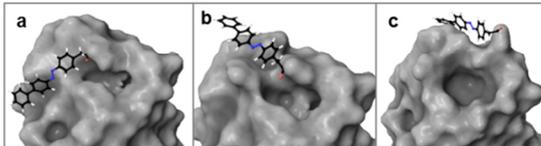
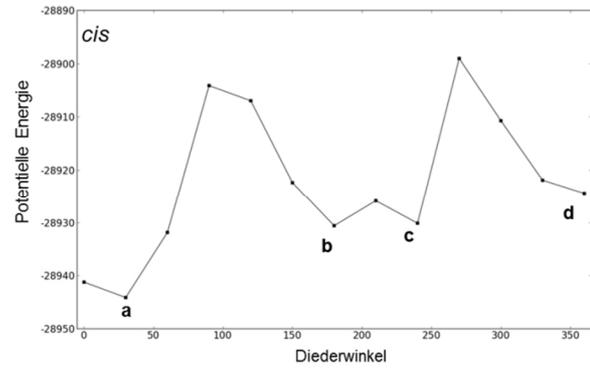
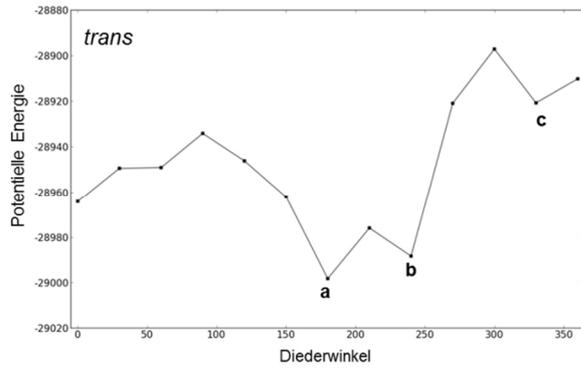
120	180	-28975,4	-28978,9	-29042,4	-28902,8	-28925,3	-29012,8
150	180	-28978,5	-28978,9	-29041,4	-28902,9	-28927,9	-29003,6
180	180	-28978,3	-28998,3	-29041,8	-28904,1	-28930,3	-29003,0
210	180	-28997,0	-28983,8	-29043,8	-28903,2	-28924,9	-29001,5
240	180	-29001,5	-28993,1	-29040,8	-28903,2	-28924,2	-29001,9
270	180	-29005,9	-28975,7	-29040,7	-28906,4	-28927,3	-29020,8
300	180	-28997,5	-28968,0	-29040,5	-28907,6	-28929,0	-29023,6
330	180	-28980,3	-28964,8	-29036,6	-28904,3	-28925,9	-29012,2
360	180	-28977,2	-28961,9	-29035,1	-28901,3	-28924,5	-29016,0
0	210	-28966,7	-28959,9	-29021,6	-28895,2	-28918,7	-29006,7
30	210	-28970,2	-28963,7	-29021,8	-28898,5	-28920,4	-29006,1
60	210	-28974,0	-28968,8	-29025,2	-28902,1	-28925,5	-29002,1
90	210	-28973,0	-28976,0	-29022,9	-28900,4	-28925,9	-28999,6
120	210	-28969,1	-28972,9	-29019,8	-28896,8	-28918,8	-28995,7
150	210	-28968,4	-28962,5	-29022,4	-28896,4	-28918,0	-28995,1
180	210	-28971,8	-28957,9	-29024,3	-28897,3	-28921,7	-28993,4
210	210	-28971,6	-28953,9	-29025,5	-28896,3	-28921,1	-29006,1
240	210	-28991,4	-28957,0	-29021,9	-28896,1	-28917,0	-29014,1
270	210	-28998,2	-28961,0	-29026,4	-28899,2	-28921,4	-29018,0
300	210	-28998,8	-28962,2	-29028,7	-28900,8	-28922,6	-29012,8
330	210	-28998,7	-28959,2	-29025,5	-28897,5	-28919,4	-28994,5
360	210	-28979,7	-28957,3	-29021,7	-28894,8	-28918,7	-28974,4
0	240	-28950,1	-28946,4	-28988,4	-28880,0	-28910,5	-28927,6
30	240	-28953,1	-28954,2	-28987,4	-28884,3	-28918,9	-28931,7
60	240	-28958,2	-28965,4	-28985,7	-28894,8	-28918,2	-28935,0
90	240	-28957,5	-28988,4	-28980,2	-28890,3	-28930,1	-28932,7
120	240	-28953,9	-28974,8	-28977,9	-28890,3	-28923,8	-28930,6
150	240	-28953,3	-28978,0	-29001,7	-28888,9	-28917,7	-28934,9
180	240	-28954,1	-28961,9	-29009,9	-28887,8	-28914,1	-28935,6
210	240	-28953,6	-28957,7	-29007,7	-28882,6	-28907,1	-28935,0
240	240	-28954,0	-28958,2	-29006,8	-28880,3	-28900,3	-28932,9
270	240	-28957,3	-28961,7	-29010,0	-28883,3	-28898,4	-28930,2
300	240	-28958,0	-28963,7	-29010,8	-28885,1	-28897,8	-28931,7
330	240	-28953,0	-28961,6	-28999,8	-28882,4	-28893,7	-28929,2
360	240	-28949,6	-28976,7	-28987,4	-28879,9	-28892,0	-28927,6
0	270	-28946,0	-21517,1	-19487,6	-28881,3	-28897,1	-28914,4
30	270	-28958,7	-28880,3	-28950,8	-28874,9	-28898,0	-28922,8
60	270	-28969,6	-28837,0	-29017,9	-28871,1	-28899,1	-28930,1
90	270	-28971,8	-28888,5	-29019,9	-28871,9	-28895,9	-28932,0
120	270	-28973,2	-22706,7	-29010,2	-28876,9	-28890,5	-28931,3
150	270	-28949,3	-28915,9	-29010,3	-28877,4	-28888,1	-28928,0
180	270	-28945,8	-28916,0	-29009,0	-28878,5	-28888,2	-28927,2
210	270	-28943,9	-28907,4	-29010,6	-28875,5	-28886,4	-28925,7

240	270	-28943,2	-28891,2	-29008,8	-28872,0	-28885,4	-28925,3
270	270	-28946,5	-28894,2	-29012,1	-28874,3	-28888,2	-28929,2
300	270	-28948,8	-28904,4	-29016,5	-28877,8	-28890,7	-28934,2
330	270	-28970,3	-28920,9	-29027,5	-28903,1	-28890,5	-28933,9
360	270	-28972,1	-28881,5	-29021,7	-28880,7	-28897,3	-28929,6
0	300	-28965,5	-28783,0	-28991,6	-22450,5	-28896,1	-28915,9
30	300	-28922,5	-28776,2	-29007,0	-28860,2	-28886,6	-28921,8
60	300	-28949,0	-28877,3	-29028,3	-28864,4	-28905,9	-28936,6
90	300	-28961,9	-28872,8	-29039,2	-28880,4	-28910,7	-28945,0
120	300	-28958,2	-28876,2	-29019,5	-28886,2	-28901,5	-28939,7
150	300	-28957,5	-28871,5	-29016,3	-28910,4	-28898,7	-28934,0
180	300	-28955,4	-28871,1	-29016,4	-28907,7	-28896,3	-28933,6
210	300	-28953,5	-28869,9	-29015,5	-28901,8	-28894,2	-28933,9
240	300	-28952,3	-28869,0	-29015,0	-28885,9	-28893,0	-28933,2
270	300	-28955,9	-28872,9	-29018,4	-28892,4	-28896,7	-28937,0
300	300	-28960,6	-28878,4	-29020,7	-28913,6	-28902,8	-28939,9
330	300	-28981,5	-28897,1	-29016,9	-28892,2	-28907,6	-28935,5
360	300	-17412,7	-28886,9	-28998,6	-28864,5	-28897,7	-28916,0
0	330	-28980,2	-28849,2	-29017,1	-28847,1	-28881,8	-28921,5
30	330	-29002,2	-21377,3	-29025,3	-28858,9	-28894,9	-28925,7
60	330	-29021,8	-28900,9	-29042,4	-28883,4	-28912,7	-28949,9
90	330	-17316,9	-28920,7	-29041,7	-28902,6	-28917,1	-28954,3
120	330	-29022,7	-28880,4	-29030,2	-28909,8	-28908,4	-28945,9
150	330	-29024,8	-28874,9	-29026,4	-28909,1	-28904,7	-28941,1
180	330	-29023,2	-28879,5	-29029,6	-28913,6	-28905,7	-28944,8
210	330	-29018,6	-28878,3	-29029,0	-28906,9	-28904,5	-28944,8
240	330	-29013,1	-28875,9	-29026,8	-28894,7	-28910,0	-28942,9
270	330	-29024,5	-28880,6	-29027,8	-28896,8	-28921,9	-28948,5
300	330	-21420,6	-28882,7	-29029,0	-28904,8	-28919,3	-28951,1
330	330	-29033,8	-28892,3	-29027,5	-28859,9	-28909,6	-28938,8
360	330	-28963,7	-28882,8	-29018,0	-28839,6	-28881,8	-28921,5
0	360	-22492,3	-28823,7	-21124,4	-28849,6	-28880,2	-28922,1
30	360	-28994,7	-28894,8	-29001,5	-28870,8	-28900,7	-28936,0
60	360	-29017,8	-28921,4	-29038,1	-28898,2	-28919,8	-28957,5
90	360	-29012,5	-28896,5	-29037,8	-28919,7	-28915,7	-28955,1
120	360	-28998,4	-28882,1	-29030,8	-28911,2	-28907,1	-28945,3
150	360	-29000,7	-28884,6	-29030,6	-28911,8	-28906,9	-28945,8
180	360	-29014,2	-28887,9	-29035,7	-28910,6	-28910,0	-28950,6
210	360	-29013,4	-28884,3	-29033,2	-28899,1	-28916,2	-28948,5
240	360	-29013,6	-28883,3	-29027,8	-28903,1	-28921,1	-28946,4
270	360	-29012,5	-28888,5	-29029,8	-28869,7	-28924,4	-28948,4
300	360	-28962,6	-28910,2	-29043,0	-28812,9	-28919,9	-28911,8
330	360	-21234,1	-28906,2	-29032,2	-28744,1	-28891,0	-28866,6
360	360	-19444,9	-28834,6	-29021,1	-28715,5	-28887,4	-28865,6

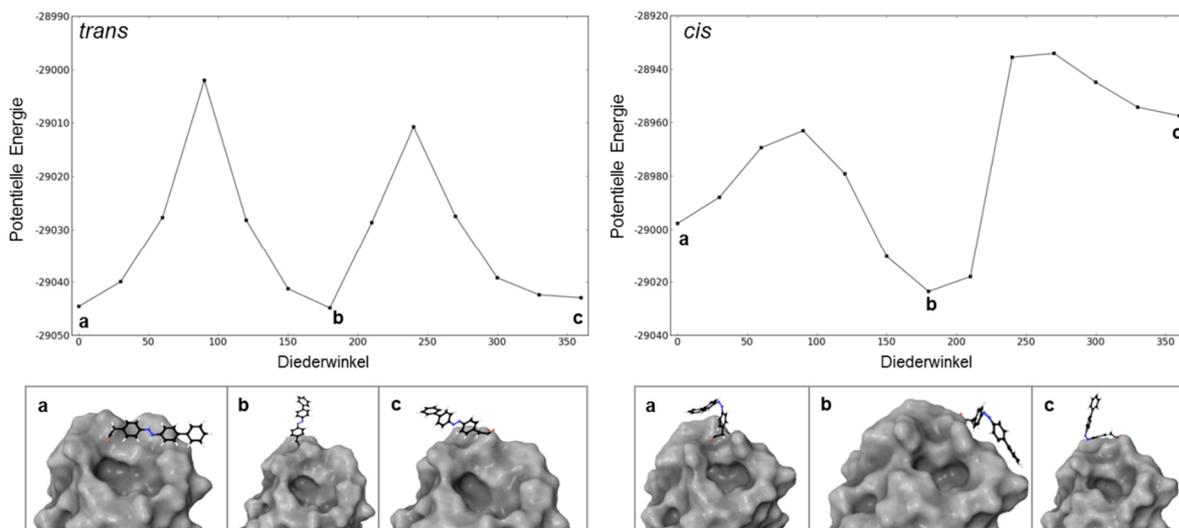
TYR48 *closed gate*-Struktur



TYR137 *closed gate*-Struktur



THR51 closed gate-Struktur



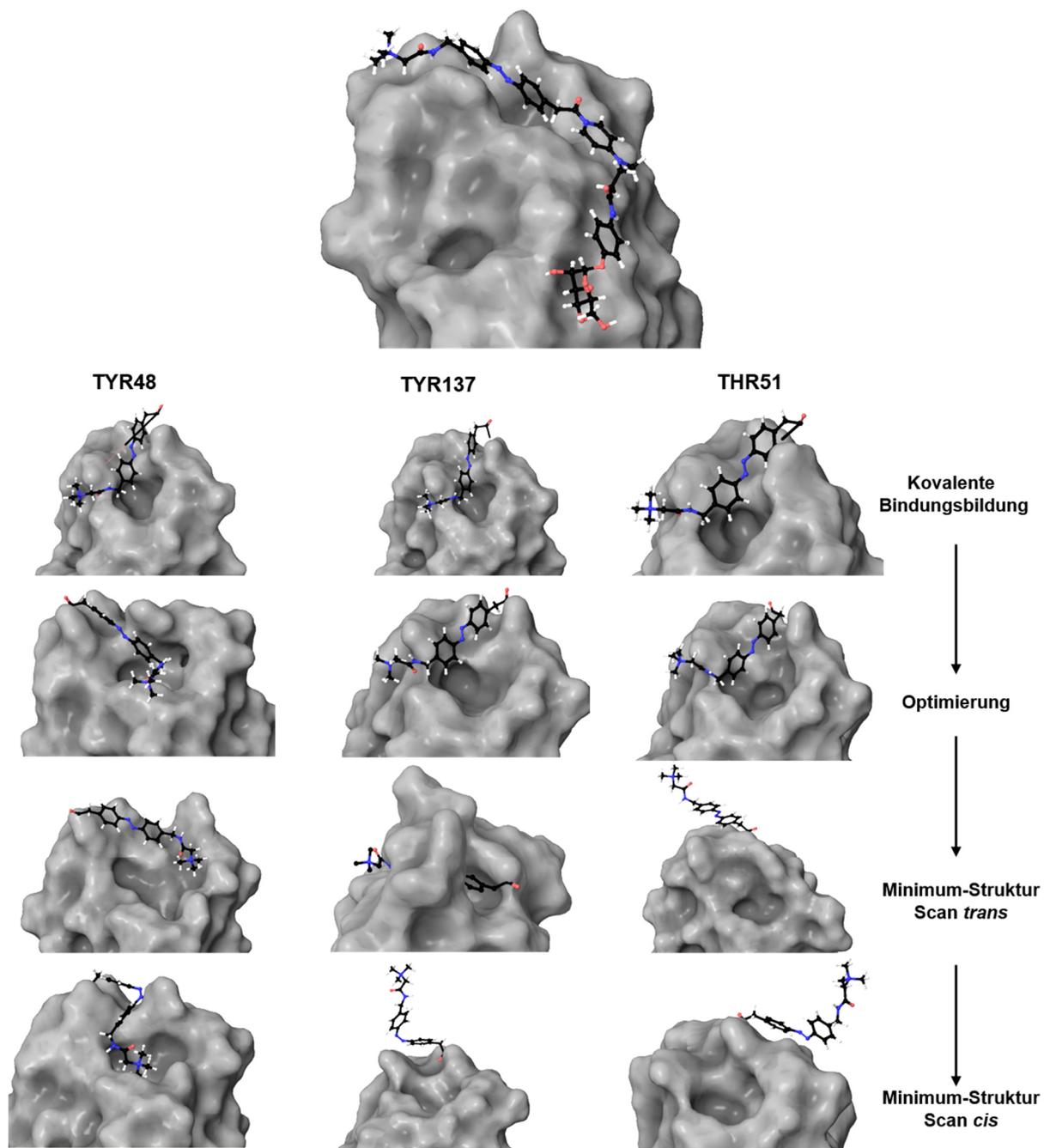


Abb. 136: Übersicht des Prozesses der kovalenten Bindungsbildung und Darstellung der Minimumstrukturen für die Bindung von **55** an TYR48, TYR137 und THR51 in der *open gate*-Struktur.

Tab. 49: 55 open gate-Struktur. Berechnete Energien nach Verstellung der Diederwinkel 1 und 2 in 30 °-Schritten für die Bindung des Azobenzols an TYR48, TYR137 und THR51 in *trans*- und *cis*-Konfiguration.

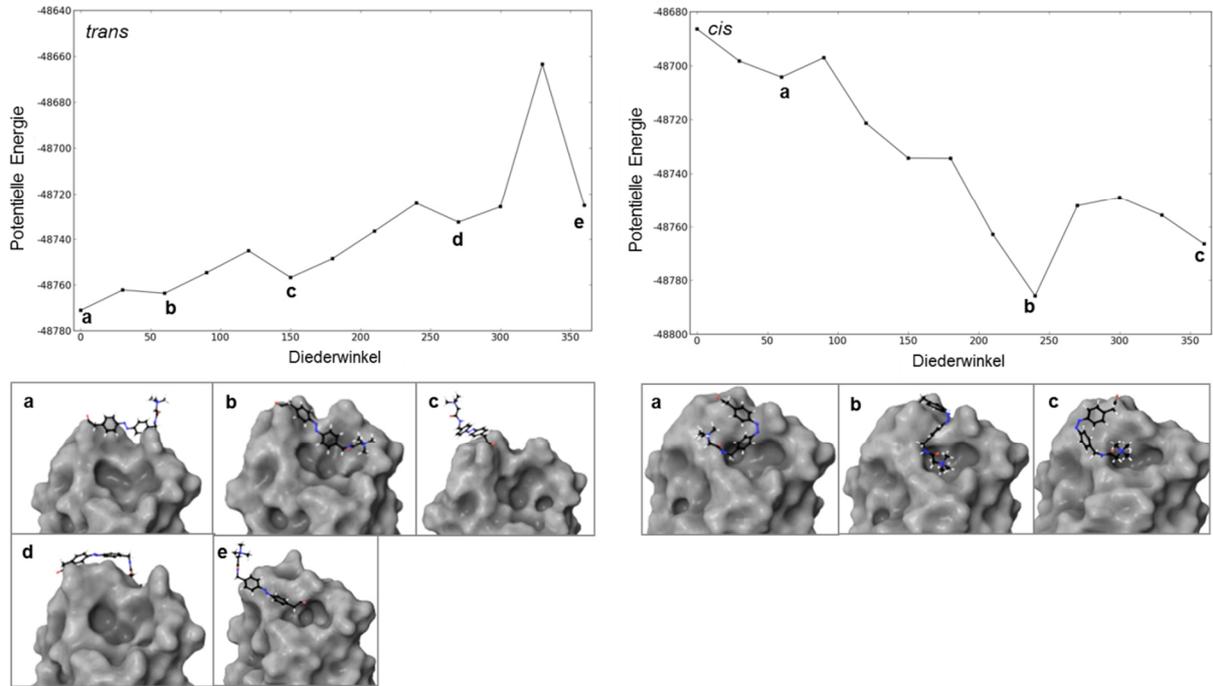
DW1	DW2	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>
		TYR48	TYR137	THR51	TYR48	TYR137	THR51
0	0	-48519,2	-48681,5	-48647,8	-48470,7	-48601,8	-48446,1
30	0	-48620,2	-48678,7	-48705,8	-48475,6	-48655,5	-48501,1
60	0	-48627,7	-48686,5	-48706,5	-48510,9	-48676,6	-48528,4
90	0	-48604,7	-48753,0	-48698,9	-48593,4	-48678,6	-48513,2
120	0	-48603,0	-48731,9	-48739,0	-48644,9	-48664,7	-48500,9
150	0	-48603,1	-48731,5	-48740,3	-48672,1	-48659,8	-48495,6
180	0	-48606,9	-48735,7	-48758,6	-48675,2	-48665,3	-48501,1
210	0	-48603,2	-48747,0	-48754,7	-48671,8	-48662,0	-48498,6
240	0	-48602,4	-48749,9	-48751,1	-48670,7	-48673,9	-48542,4
270	0	-48608,6	-48756,5	-48748,9	-48677,2	-48677,5	-48548,3
300	0	-48623,4	-41724,9	-48741,0	-48686,5	-48676,4	-48542,2
330	0	-48613,5	-41258,9	-48729,7	-48652,5	-48648,2	-48515,7
360	0	-48503,9	-34658,8	-48741,8	-48623,1	-48625,9	-48529,5
0	30	-48499,8	-48587,8	-48751,5	-48624,0	-48638,7	-48536,9
30	30	-48529,4	-48622,1	-48773,2	-48665,1	-48661,8	-48556,3
60	30	-48572,9	-48666,4	-48765,0	-48698,3	-48671,1	-48564,7
90	30	-48566,8	-48662,5	-48754,6	-48677,9	-48664,5	-48554,1
120	30	-48565,6	-48659,2	-48747,1	-48670,0	-48658,3	-48549,7
150	30	-48568,5	-48662,0	-48752,2	-48673,5	-48659,6	-48551,7
180	30	-48572,0	-48662,6	-48754,6	-48671,9	-48659,3	-48551,0
210	30	-48565,9	-48658,7	-48750,0	-48670,9	-48657,1	-48546,8
240	30	-48566,4	-48660,4	-48738,6	-48677,5	-48672,7	-48552,6
270	30	-48558,5	-48725,3	-48745,7	-48714,8	-48675,7	-48558,2
300	30	-48550,0	-48716,9	-48751,3	-48694,3	-48660,4	-48553,8
330	30	-48536,8	-48705,3	-48730,9	-48669,8	-48634,1	-48536,8
360	30	-48535,9	-48702,3	-48734,4	-48661,1	-48638,2	-48538,0
0	60	-48547,7	-48680,9	-48735,7	-48663,3	-48651,4	-48542,4
30	60	-48557,4	-48692,4	-48741,6	-48704,1	-48658,7	-48551,8
60	60	-48560,1	-48698,6	-48740,5	-48695,7	-48660,5	-48551,6
90	60	-48546,7	-48695,4	-48743,0	-48678,3	-48655,5	-48544,9
120	60	-48540,3	-48692,1	-48740,9	-48671,5	-48651,4	-48539,5
150	60	-48549,8	-48692,9	-48741,5	-48665,5	-48651,6	-48541,3
180	60	-48555,4	-48693,5	-48741,1	-48671,0	-48651,9	-48541,0
210	60	-48557,8	-48691,0	-48741,7	-48668,6	-48664,8	-48541,7
240	60	-48552,2	-48709,2	-48744,4	-48704,3	-48662,2	-48544,9
270	60	-48547,5	-48714,7	-48765,4	-48704,2	-48666,4	-48551,5
300	60	-48543,8	-48702,6	-48783,2	-48689,1	-48652,5	-48547,2
330	60	-48540,9	-41024,2	-48772,5	-48672,4	-48644,6	-48541,9
360	60	-48541,7	-48574,6	-48751,0	-48663,4	-48651,2	-48542,5

0	90	-48547,4	-48591,4	-48741,5	-48697,1	-48649,1	-48540,6
30	90	-48550,4	-48596,9	-48757,3	-48685,7	-48651,0	-48542,3
60	90	-48546,3	-48601,1	-48741,1	-48688,6	-48651,8	-48543,8
90	90	-48540,3	-48598,9	-48738,5	-48686,4	-48648,2	-48537,1
120	90	-48534,2	-48596,0	-48734,8	-48677,7	-48644,5	-48533,0
150	90	-48534,9	-48596,7	-48735,2	-48687,9	-48644,9	-48533,6
180	90	-48539,5	-48597,9	-48736,9	-48693,4	-48646,1	-48535,7
210	90	-48537,4	-48596,6	-48737,1	-48684,3	-48645,9	-48536,7
240	90	-48539,8	-48643,3	-48738,0	-48671,2	-48654,4	-48538,6
270	90	-48538,7	-48615,4	-48759,5	-48663,3	-48659,8	-48544,8
300	90	-48547,2	-48655,4	-48774,1	-48641,7	-48658,2	-48552,3
330	90	-48550,4	-48615,7	-48752,5	-48641,9	-48652,7	-48545,7
360	90	-48547,8	-48357,1	-48743,8	-48660,7	-48648,4	-48541,2
0	120	-48560,3	-48501,5	-48798,8	-48692,2	-48652,6	-48551,4
30	120	-48559,4	-48497,0	-48786,2	-48702,2	-48655,8	-48565,2
60	120	-48556,1	-48486,0	-48785,5	-48699,8	-48659,1	-48567,7
90	120	-48551,0	-48488,3	-48762,4	-48681,4	-48657,4	-48564,2
120	120	-48544,1	-48486,1	-48757,4	-48675,4	-48654,1	-48552,8
150	120	-48545,0	-48487,0	-48757,9	-48702,5	-48654,4	-48551,6
180	120	-48558,1	-48488,4	-48759,1	-48704,0	-48655,2	-48553,1
210	120	-48569,5	-48487,8	-48758,2	-48689,1	-48655,3	-48552,4
240	120	-48570,8	-48487,4	-48758,4	-48700,3	-48656,0	-48553,7
270	120	-48570,0	-48490,3	-48761,2	-48689,0	-48660,4	-48559,2
300	120	-48569,2	-48513,1	-48772,8	-48721,4	-48662,0	-48559,7
330	120	-48558,4	-48694,4	-48792,2	-48705,2	-48657,8	-48557,6
360	120	-48553,7	-48695,0	-48783,5	-48689,3	-48653,8	-48551,9
0	150	-48567,9	-48698,1	-48853,1	-48712,5	-48678,3	-48588,0
30	150	-48571,6	-48693,3	-48811,5	-48713,4	-48681,9	-48591,0
60	150	-48577,0	-48701,6	-48809,5	-48700,0	-48687,0	-48593,7
90	150	-48574,2	-48699,0	-48790,0	-48720,4	-48686,8	-48592,6
120	150	-48567,9	-48693,8	-48785,6	-48721,4	-48684,3	-48587,8
150	150	-48575,8	-48677,6	-48786,0	-48716,7	-48686,5	-48575,6
180	150	-48577,9	-48677,2	-48787,1	-48729,0	-48689,3	-48577,3
210	150	-48574,6	-48675,9	-48786,2	-48717,3	-48686,6	-48576,5
240	150	-48572,2	-48675,9	-48786,5	-48704,0	-48685,0	-48577,3
270	150	-48580,4	-48682,5	-48790,4	-48715,1	-48688,1	-48579,3
300	150	-48578,5	-48688,0	-48800,0	-48707,2	-48685,9	-48583,6
330	150	-48571,0	-48726,8	-48804,7	-48734,3	-48682,3	-48587,6
360	150	-48568,8	-48717,1	-48819,9	-48725,6	-48679,4	-48589,2
0	180	-48579,1	-48716,7	-48816,4	-48731,4	-48686,6	-48600,5
30	180	-48581,3	-48718,9	-48815,3	-48718,0	-48690,0	-48599,7
60	180	-48581,5	-48721,1	-48819,2	-48734,4	-48695,3	-48604,7
90	180	-48578,2	-48723,6	-48822,4	-48731,4	-48696,0	-48606,0

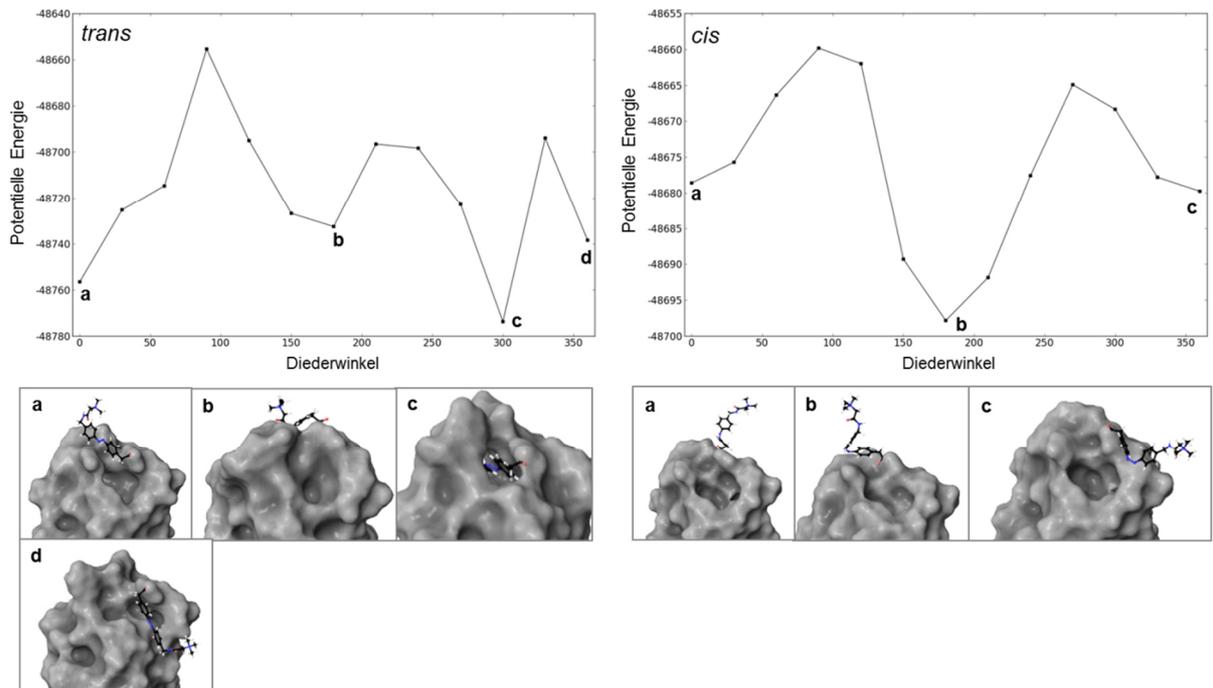
120	180	-48572,7	-48699,3	-48807,4	-48722,5	-48696,1	-48601,3
150	180	-48572,7	-48699,6	-48806,7	-48705,0	-48696,0	-48586,4
180	180	-48574,9	-48700,3	-48807,5	-48712,9	-48697,8	-48586,7
210	180	-48590,3	-48699,2	-48806,1	-48705,8	-48693,8	-48586,5
240	180	-48592,4	-48698,6	-48806,8	-48716,8	-48690,9	-48586,9
270	180	-48590,6	-48701,5	-48805,7	-48714,8	-48691,8	-48591,1
300	180	-48591,5	-48732,6	-48811,2	-48717,2	-48692,2	-48601,9
330	180	-48589,6	-48721,9	-48826,0	-48734,4	-48689,6	-48602,1
360	180	-48585,4	-41762,0	-48819,3	-48731,4	-48686,5	-48600,8
0	210	-48574,0	-48696,5	-48825,3	-48720,8	-48680,9	-48584,0
30	210	-48572,7	-48696,1	-48815,2	-48711,2	-48685,2	-48583,0
60	210	-48574,2	-48680,2	-48810,6	-48726,5	-48691,6	-48592,0
90	210	-48572,1	-48682,4	-48795,2	-48735,5	-48691,9	-48588,4
120	210	-48567,3	-48664,8	-48791,3	-48719,1	-48691,5	-48575,4
150	210	-48565,0	-48685,9	-48790,9	-48762,9	-48691,0	-48574,4
180	210	-48564,3	-48689,5	-48791,6	-48748,1	-48688,4	-48575,9
210	210	-48563,6	-48689,0	-48796,8	-48741,2	-48685,4	-48575,8
240	210	-48587,2	-48690,9	-48796,7	-48739,4	-48683,2	-48577,7
270	210	-48592,9	-48694,0	-48798,5	-48735,8	-48685,1	-48584,1
300	210	-48594,7	-48694,5	-48811,0	-48739,6	-48686,3	-48593,1
330	210	-48587,0	-48687,8	-48847,8	-48740,3	-48682,3	-48594,1
360	210	-48579,6	-48681,3	-48821,8	-48741,9	-48680,1	-48584,7
0	240	-48569,9	-48665,6	-48819,9	-48736,9	-48665,3	-48559,0
30	240	-48560,2	-48687,3	-48815,7	-48756,0	-48669,7	-48571,4
60	240	-48552,9	-48698,3	-48826,9	-48785,8	-48677,2	-48567,9
90	240	-48547,7	-48679,2	-48810,1	-48780,5	-48677,6	-48559,4
120	240	-48543,2	-48688,3	-48804,3	-48756,5	-48675,9	-48551,9
150	240	-48543,9	-48683,9	-48802,6	-48719,3	-48676,1	-48550,5
180	240	-48543,9	-48677,8	-48802,1	-48720,9	-48672,8	-48551,9
210	240	-48543,9	-48673,5	-48801,7	-48719,4	-48669,0	-48552,1
240	240	-48543,0	-48672,2	-48802,5	-48735,6	-48667,4	-48555,3
270	240	-48545,8	-48678,4	-48807,4	-48732,9	-48668,8	-48566,6
300	240	-48547,2	-48679,6	-48817,5	-48730,9	-48669,1	-48576,3
330	240	-48544,2	-48680,6	-48821,4	-48726,0	-48666,8	-48568,9
360	240	-48541,7	-48677,8	-39297,0	-48719,2	-48665,0	-48563,1
0	270	-48521,1	-48702,9	-48811,8	-48722,8	-48649,9	-48548,1
30	270	-48520,4	-48703,1	-48823,6	-48724,2	-48651,0	-48531,7
60	270	-48523,6	-41297,5	-48814,1	-48725,9	-48658,0	-48532,9
90	270	-48525,5	-48701,9	-48819,2	-48734,3	-48662,6	-48535,3
120	270	-48524,6	-48710,0	-48818,3	-48752,2	-48663,5	-48533,3
150	270	-48525,9	-41289,2	-48817,6	-48745,4	-48664,9	-48534,2
180	270	-48526,2	-48713,4	-48817,3	-48732,5	-48660,7	-48535,0
210	270	-48524,4	-48707,2	-48818,9	-48711,1	-48655,7	-48534,6
240	270	-48523,7	-48708,5	-48818,8	-48710,4	-48653,2	-48534,3

270	270	-48525,8	-48709,2	-48822,6	-48717,3	-48654,1	-48540,1
300	270	-48527,1	-48712,9	-48839,8	-48723,0	-48654,5	-48549,9
330	270	-48523,9	-48722,9	-48844,7	-48722,5	-48652,8	-48548,6
360	270	-48521,5	-41354,1	-48838,6	-48722,8	-48650,0	-48548,3
0	300	-48528,4	-48744,0	-48815,0	-48718,5	-48647,6	-48519,6
30	300	-48534,4	-48773,7	-48792,7	-48707,0	-48649,5	-48519,9
60	300	-48543,9	-48661,4	-48804,7	-48707,9	-48660,1	-48539,9
90	300	-48545,2	-48599,2	-48818,5	-48727,2	-48668,3	-48548,1
120	300	-48539,4	-48577,4	-48834,0	-48749,0	-48668,3	-48542,3
150	300	-48536,3	-48588,2	-48830,4	-48745,1	-48665,1	-48540,4
180	300	-48536,4	-48560,9	-48830,7	-48733,8	-48659,3	-48541,3
210	300	-48534,1	-48553,7	-48830,2	-48742,5	-48654,6	-48540,7
240	300	-48530,8	-48550,2	-48829,1	-48714,9	-48650,8	-48540,3
270	300	-48555,1	-48563,1	-48831,9	-48718,9	-48652,5	-48544,7
300	300	-48561,4	-36980,0	-48834,8	-48729,0	-48655,9	-48549,5
330	300	-48560,3	-48607,9	-48832,8	-48732,5	-48666,2	-48549,9
360	300	-48549,5	-48611,6	-48813,3	-48718,4	-48654,2	-48529,1
0	330	-48528,3	-41008,5	-48788,2	-48697,5	-48616,4	-48535,5
30	330	-48545,8	-48625,8	-48789,8	-48694,7	-48613,9	-48544,1
60	330	-48554,9	-48644,4	-48817,1	-48713,1	-48637,1	-48567,2
90	330	-48563,5	-48639,8	-48850,7	-48731,1	-48672,5	-48570,8
120	330	-48559,5	-48628,5	-48842,5	-48725,1	-48664,6	-48561,0
150	330	-48555,1	-48633,4	-48840,4	-48738,7	-48660,7	-48558,8
180	330	-48557,1	-48662,6	-48844,5	-48745,5	-48663,4	-48562,5
210	330	-48555,7	-48650,9	-48843,2	-48753,7	-48661,4	-48561,9
240	330	-48552,1	-48654,0	-48840,8	-48753,4	-48657,6	-48560,4
270	330	-48556,9	-48670,2	-48839,7	-48755,7	-48676,7	-48562,9
300	330	-48560,0	-41004,4	-48838,1	-48754,3	-48677,8	-48562,8
330	330	-48549,3	-48656,2	-48826,7	-48747,7	-48668,6	-48542,0
360	330	-48529,3	-48693,9	-48787,9	-48717,1	-48641,5	-48517,8
0	360	-48540,9	-41069,8	-48819,5	-48708,2	-48632,7	-48540,3
30	360	-48554,3	-48702,7	-48825,2	-48722,0	-48649,4	-48557,4
60	360	-48565,6	-48738,5	-48855,1	-48755,1	-48674,4	-48578,6
90	360	-48566,6	-48712,8	-48855,2	-48713,4	-48673,3	-48569,5
120	360	-48558,2	-48708,4	-48845,1	-48707,1	-48664,3	-48563,0
150	360	-48557,9	-48713,0	-48845,8	-48708,3	-48664,3	-48563,9
180	360	-48561,1	-48702,5	-48850,9	-48710,0	-48667,0	-48569,7
210	360	-48557,0	-48709,2	-48847,8	-48703,8	-48663,1	-48567,2
240	360	-48555,0	-41672,0	-48842,2	-48733,7	-48675,6	-48564,3
270	360	-48561,1	-48689,5	-48840,3	-48756,2	-48679,8	-48563,9
300	360	-48558,3	-48675,3	-48831,0	-48766,5	-48678,6	-48556,3
330	360	-48537,7	-48681,5	-48801,4	-48716,3	-48650,3	-48526,9
360	360	-48522,7	-41024,4	-48783,9	-48680,6	-48627,6	-48538,8

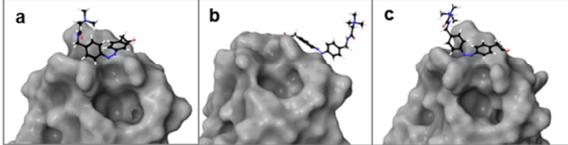
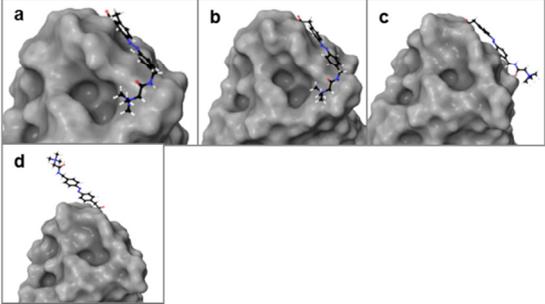
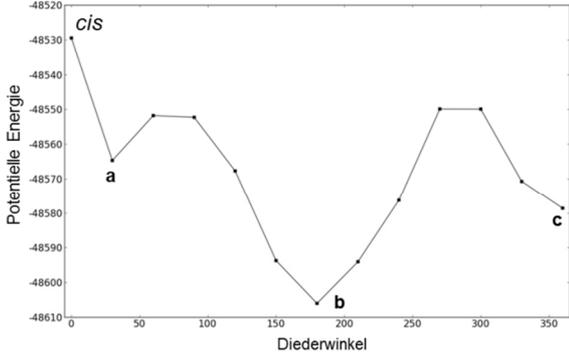
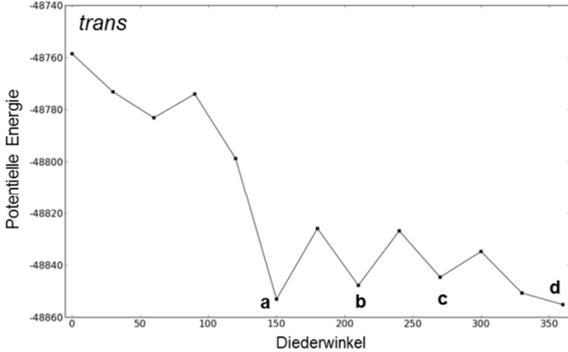
TYR48 *open gate*-Struktur



TYR137 *open gate*-Struktur



THR51 open gate-Struktur



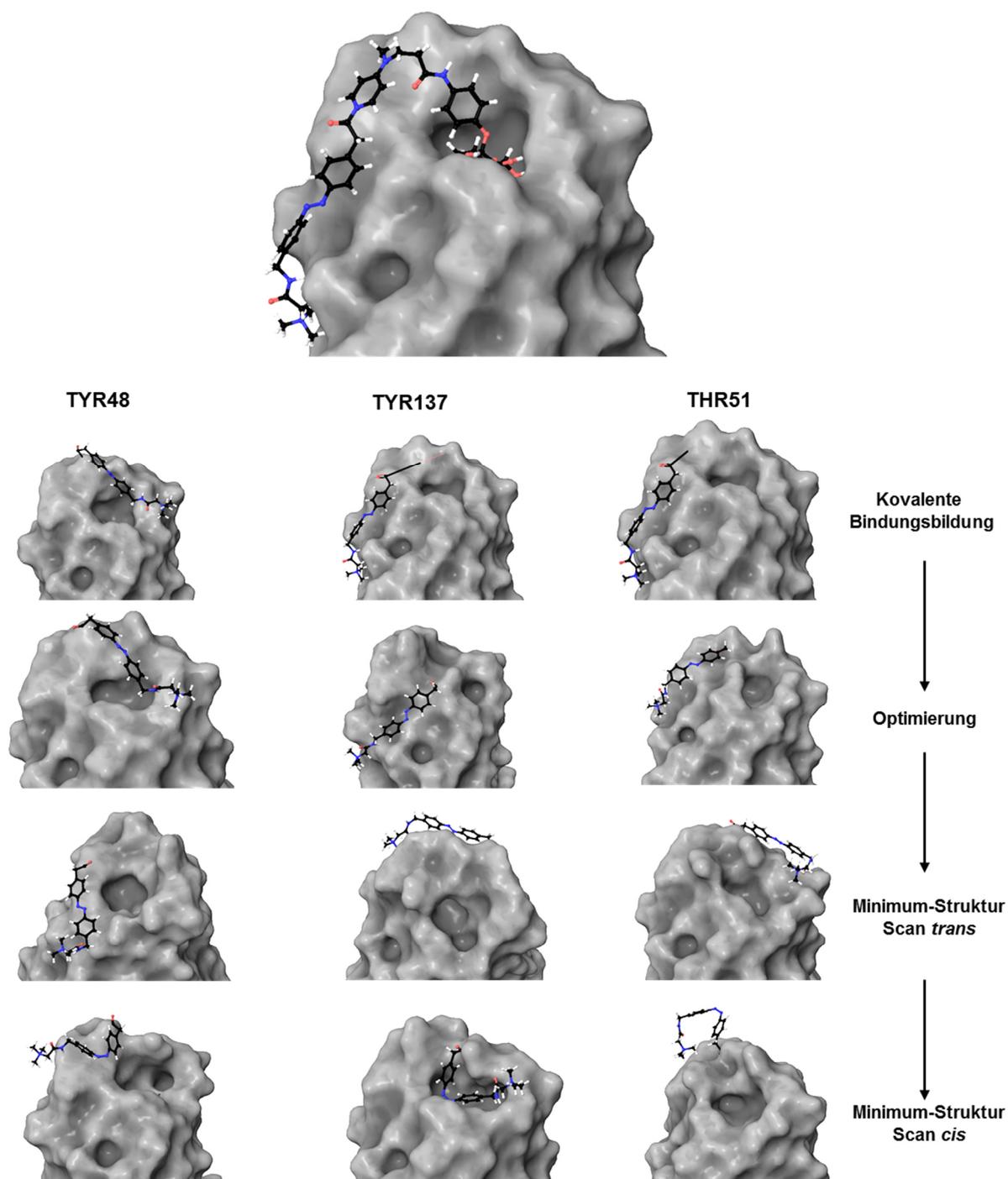


Abb. 137 Übersicht des Prozesses der kovalenten Bindungsbildung und Darstellung der Minimumstrukturen für die Bindung von **55** an TYR48, TYR137 und THR51 in der *closed gate*-Struktur.

Tab. 50: 55 closed gate-Struktur. Berechnete Energien nach Verstellung der Diederwinkel 1 und 2 in 30°- Schritten für die Bindung des Azobenzols an TYR48, TYR137 und THR51 in *trans*- und *cis*-Konfiguration.

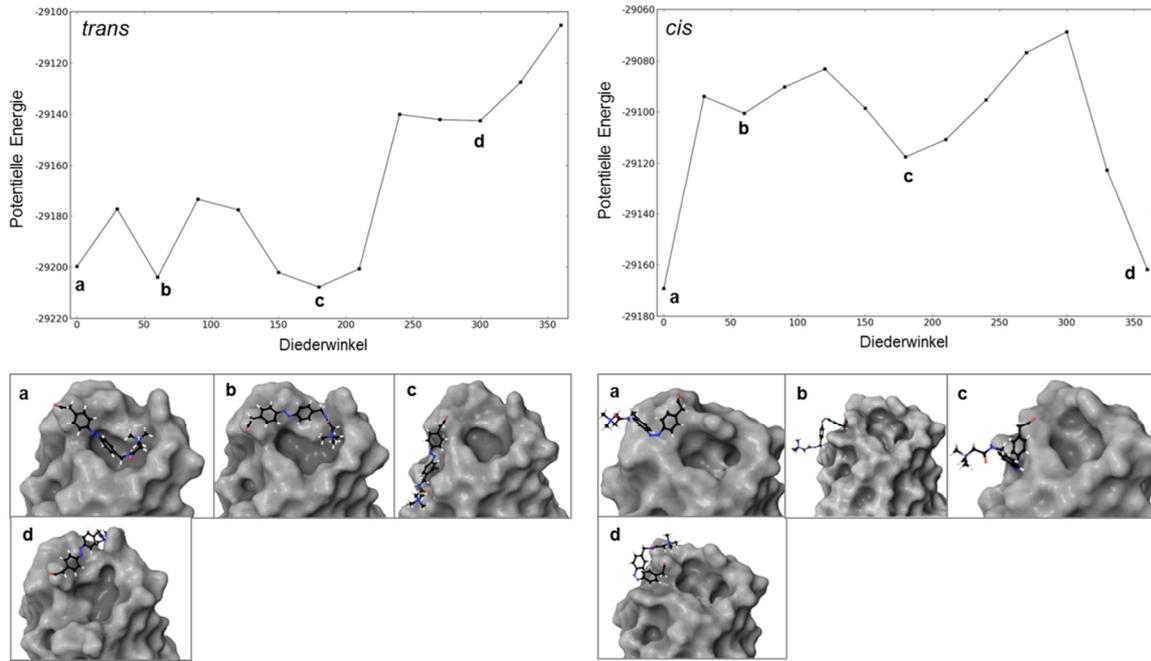
DW1	DW2	<i>trans</i> TYR48	<i>trans</i> TYR137	<i>trans</i> THR51	<i>cis</i> TYR48	<i>cis</i> TYR137	<i>cis</i> THR51
0	0	-28997,8	-29028,4	-29141,6	-28941,7	-28963,1	-29124,7
30	0	-22663,7	-29112,9	-29167,7	-28937,4	-29090,7	-29121,9
60	0	-22095,5	-29113,9	-29194,1	-28964,6	-29185,0	-29183,2
90	0	-29109,3	-29119,5	-29195,7	-29041,3	-29186,4	-29191,1
120	0	-29112,1	-29114,3	-29196,5	-29142,2	-29125,5	-29188,0
150	0	-29113,8	-29114,9	-29206,8	-29125,5	-29126,0	-29189,2
180	0	-29116,3	-29120,6	-29209,9	-29129,5	-29127,7	-29212,4
210	0	-29112,2	-29116,0	-29205,6	-29126,3	-29120,1	-29208,5
240	0	-29165,8	-29112,8	-29205,6	-29125,4	-29120,2	-29203,8
270	0	-29165,9	-29120,7	-29203,3	-29139,9	-29121,0	-29180,1
300	0	-29178,3	-29115,5	-29208,6	-29169,3	-29131,5	-29171,0
330	0	-29199,8	-29129,1	-29189,2	-29023,7	-29091,8	-29153,6
360	0	-29146,7	-29099,4	-29161,3	-29006,5	-29084,8	-29125,2
0	30	-29136,1	-29087,4	-29159,4	-29003,3	-29088,7	-29116,4
30	30	-29158,1	-29102,1	-29176,4	-29031,3	-29102,6	-29148,8
60	30	-29163,3	-29114,3	-29192,8	-29035,7	-29139,4	-29166,3
90	30	-29159,1	-29112,8	-29197,5	-29031,1	-29124,7	-29167,2
120	30	-29155,3	-29108,6	-29200,3	-29044,8	-29110,0	-29165,1
150	30	-29157,5	-29113,0	-29210,6	-29044,3	-29113,2	-29181,8
180	30	-29157,6	-29114,7	-29210,9	-29040,1	-29115,2	-29178,8
210	30	-29177,4	-29109,3	-29211,5	-29094,0	-29112,6	-29187,2
240	30	-22150,2	-29112,3	-29206,1	-29075,4	-29114,2	-29172,6
270	30	-29052,7	-29115,7	-29208,4	-29055,9	-29130,3	-29166,6
300	30	-29164,3	-29137,8	-29208,4	-29060,8	-29113,1	-29171,1
330	30	-22658,1	-29103,2	-29185,9	-29045,3	-29087,2	-29133,6
360	30	-21508,5	-29086,8	-29154,9	-29030,0	-29084,3	-29118,9
0	60	-29171,1	-29091,8	-29176,1	-29068,0	-29088,6	-29133,8
30	60	-29156,6	-29100,3	-29186,3	-29072,6	-29089,8	-29152,5
60	60	-29153,8	-29105,5	-29186,8	-29083,8	-29090,2	-29151,0
90	60	-29145,9	-29102,5	-29190,7	-29074,5	-29107,3	-29154,3
120	60	-29145,4	-29099,1	-29193,4	-29071,2	-29101,6	-29165,0
150	60	-29145,8	-29102,4	-29199,0	-29072,3	-29102,2	-29168,1
180	60	-29148,5	-29101,1	-29200,8	-29072,5	-29114,6	-29167,7
210	60	-29188,2	-29100,3	-29198,7	-29071,3	-29118,8	-29167,0
240	60	-17529,6	-29105,0	-29195,6	-29100,6	-29136,6	-29167,2
270	60	-29196,9	-29104,6	-29211,8	-29094,8	-29127,2	-29166,1
300	60	-29204,0	-29130,6	-29191,3	-29078,0	-29107,7	-29147,2
330	60	-22909,0	-29099,6	-29172,8	-29067,7	-29099,4	-29122,1

360	60	-29171,5	-29092,1	-29168,0	-29068,4	-29103,1	-29134,0
0	90	-29146,3	-29096,3	-29206,3	-29067,5	-29101,3	-29173,8
30	90	-29148,7	-29098,0	-29213,4	-29066,5	-29101,4	-29182,9
60	90	-29151,3	-29100,4	-29217,0	-29068,6	-29103,1	-29183,1
90	90	-29148,5	-29097,7	-29214,7	-29067,5	-29099,3	-29197,8
120	90	-29145,3	-29094,7	-29212,2	-29065,3	-29094,8	-29196,3
150	90	-29145,8	-29093,3	-29213,4	-29065,2	-29103,3	-29198,5
180	90	-29146,9	-29113,9	-29213,5	-29067,1	-29109,2	-29188,0
210	90	-29145,2	-29127,8	-29242,0	-29065,7	-29112,6	-29186,8
240	90	-29145,5	-29105,8	-29212,5	-29066,7	-29115,0	-29179,9
270	90	-29173,6	-29097,3	-29279,1	-29090,3	-29113,1	-29173,1
300	90	-29158,6	-29096,6	-29253,6	-29081,8	-29110,7	-29187,8
330	90	-29163,1	-29096,6	-29225,6	-29073,8	-29103,5	-29177,7
360	90	-29142,8	-29093,9	-29217,4	-29067,3	-29099,4	-29167,8
0	120	-29154,0	-29103,9	-29233,8	-29076,2	-29106,6	-29194,0
30	120	-29156,0	-29104,7	-29237,7	-29078,8	-29108,5	-29196,8
60	120	-29158,6	-29108,0	-29241,5	-29081,5	-29111,5	-29199,3
90	120	-29157,0	-29107,7	-29239,4	-29080,3	-29109,7	-29200,5
120	120	-29156,0	-29105,9	-29236,6	-29077,6	-29105,8	-29208,8
150	120	-29156,9	-29105,5	-29238,7	-29078,3	-29106,3	-29211,3
180	120	-29158,2	-29107,9	-29240,8	-29079,5	-29107,3	-29210,5
210	120	-29157,7	-29125,2	-29239,7	-29078,7	-29106,8	-29201,5
240	120	-29156,9	-29133,0	-29238,9	-29078,9	-29108,5	-29206,1
270	120	-29160,9	-29115,4	-29243,3	-29082,2	-29113,9	-29206,1
300	120	-29168,7	-29107,3	-29250,4	-29083,2	-29115,2	-29204,4
330	120	-29177,7	-29105,4	-29243,5	-29083,3	-29110,5	-29201,4
360	120	-29173,1	-29103,4	-29235,3	-29076,1	-29106,7	-29194,4
0	150	-29189,9	-29121,0	-29258,8	-29091,7	-29122,8	-29218,2
30	150	-29202,1	-29128,3	-29262,8	-29094,1	-29124,9	-29221,5
60	150	-29195,7	-29134,3	-29270,0	-29098,1	-29128,5	-29229,3
90	150	-29195,5	-29131,0	-29271,5	-29096,4	-29126,8	-29230,3
120	150	-29188,2	-29127,2	-29267,3	-29093,5	-29123,3	-29226,4
150	150	-29182,1	-29125,9	-29265,2	-29094,3	-29124,2	-29225,2
180	150	-29162,3	-29137,6	-29266,5	-29095,5	-29125,2	-29226,5
210	150	-29171,2	-29133,2	-29264,5	-29094,5	-29124,2	-29223,5
240	150	-29171,5	-29055,3	-29262,1	-29094,2	-29124,5	-29221,6
270	150	-29175,4	-28924,6	-29264,7	-29097,1	-29128,3	-29224,1
300	150	-29177,4	-19242,6	-29266,2	-29098,6	-29129,9	-29224,4
330	150	-29173,4	-29125,9	-29262,1	-29094,7	-29125,9	-29221,3
360	150	-29169,4	-29139,9	-29259,0	-29092,7	-29122,3	-29217,8
0	180	-29177,3	-29144,9	-29269,9	-29112,6	-29139,9	-29244,3
30	180	-29196,1	-29145,0	-29270,2	-29115,1	-29148,3	-29245,2
60	180	-29201,2	-29146,7	-29274,2	-29117,6	-29154,6	-29248,3
90	180	-29207,8	-29141,6	-29275,0	-29117,4	-29152,8	-29244,2

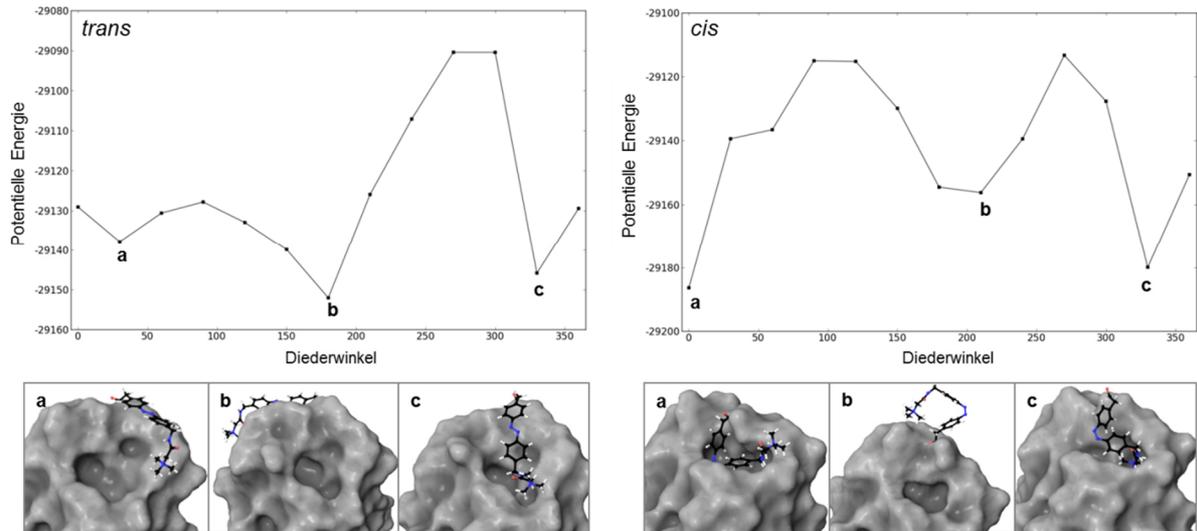
120	180	-29181,6	-29137,1	-29273,6	-29111,6	-29145,4	-29239,2
150	180	-29182,8	-29136,1	-29271,9	-29101,4	-29141,5	-29246,7
180	180	-29181,0	-29134,8	-29277,3	-29102,1	-29140,3	-29242,7
210	180	-29179,1	-29145,7	-29272,0	-29099,5	-29137,5	-29234,8
240	180	-29178,8	-29110,6	-29270,0	-29099,8	-29135,4	-29235,1
270	180	-29181,6	-29152,1	-29273,1	-29102,7	-29138,0	-29225,9
300	180	-29182,2	-29144,8	-29275,0	-29103,9	-29139,0	-29239,1
330	180	-29181,5	-29128,6	-29272,9	-29100,6	-29131,3	-29234,5
360	180	-29177,0	-29114,0	-29269,8	-29105,3	-29146,9	-29231,0
0	210	-29200,7	-29102,7	-29251,6	-29106,2	-29146,7	-29213,2
30	210	-21735,1	-29112,0	-29248,0	-29108,8	-29152,1	-29216,0
60	210	-29159,6	-29114,8	-29249,7	-29110,8	-29156,3	-29211,8
90	210	-29133,8	-29110,4	-29246,3	-29107,9	-29150,2	-29207,3
120	210	-29118,0	-29106,1	-29249,2	-29106,3	-29128,5	-29207,9
150	210	-29120,2	-29105,3	-29252,4	-29102,6	-29131,5	-29212,5
180	210	-29122,1	-29105,8	-29252,5	-29096,7	-29125,1	-29211,7
210	210	-29121,3	-29107,1	-29259,3	-29094,2	-29123,1	-29218,4
240	210	-29120,7	-29111,3	-29258,6	-29092,9	-29124,4	-29224,3
270	210	-29123,2	-29126,0	-29261,9	-29095,0	-29125,7	-29228,5
300	210	-29123,6	-29125,0	-29262,9	-29097,8	-29126,5	-29228,5
330	210	-29117,9	-29110,8	-29257,3	-29094,0	-29122,8	-29222,1
360	210	-29132,6	-29102,7	-29251,7	-29091,2	-29119,8	-29219,8
0	240	-29134,0	-29092,6	-29211,5	-29094,7	-29131,5	-29171,7
30	240	-29130,0	-29094,7	-29209,1	-29090,5	-29136,4	-29170,5
60	240	-29140,1	-29096,2	-29205,9	-29095,4	-29139,5	-29164,1
90	240	-29111,2	-29093,2	-29198,6	-29095,0	-29139,1	-29156,9
120	240	-29101,0	-29089,4	-29196,4	-29093,7	-29120,9	-29157,4
150	240	-29101,7	-29088,2	-29250,4	-29090,4	-29113,4	-29199,9
180	240	-29103,1	-29088,7	-29253,6	-29088,0	-29111,7	-29197,8
210	240	-29104,1	-29090,1	-29254,2	-29080,2	-29110,9	-29196,5
240	240	-29103,4	-29092,9	-29253,5	-29077,8	-29110,1	-29197,4
270	240	-29105,7	-29101,3	-29265,7	-29079,2	-29110,8	-29217,8
300	240	-29106,6	-29107,1	-29268,7	-29086,9	-29111,4	-29230,7
330	240	-29121,3	-29099,6	-29294,7	-29086,4	-29128,8	-29222,0
360	240	-29118,0	-29093,8	-29196,7	-29092,5	-29133,4	-29210,7
0	270	-29139,7	-29073,5	-29122,8	-22785,1	-29113,3	-29191,2
30	270	-29116,0	-29071,2	-29091,6	-29064,1	-29105,0	-29185,6
60	270	-29140,2	-29079,2	-29077,6	-29070,8	-29102,8	-29184,9
90	270	-29106,7	-29077,9	-29078,9	-29074,3	-29108,6	-29189,1
120	270	-29098,4	-29074,9	-29179,3	-29072,6	-29110,0	-29183,7
150	270	-29098,2	-29074,5	-29193,9	-29074,8	-29099,8	-29183,7
180	270	-29099,1	-29074,1	-29194,4	-29077,0	-29097,9	-29180,4
210	270	-29097,9	-29072,9	-29194,5	-29073,8	-29095,5	-29193,4

240	270	-29096,8	-29079,9	-29193,6	-29065,0	-29096,7	-29205,0
270	270	-29098,9	-29090,4	-29208,2	-29066,0	-29095,0	-29212,5
300	270	-29109,2	-29088,0	-29210,5	-29065,9	-29095,7	-29198,2
330	270	-29142,1	-29083,6	-29209,3	-29064,4	-29093,4	-29194,8
360	270	-29106,8	-29073,6	-29215,7	-29056,9	-29091,5	-29190,8
0	300	-29129,8	-29072,4	-29184,2	-29061,6	-29108,6	-29173,3
30	300	-29081,1	-29083,1	-29183,2	-29053,5	-29111,1	-29180,0
60	300	-29142,6	-29090,5	-29201,0	-29053,2	-29122,4	-29192,3
90	300	-29140,3	-29084,1	-29204,8	-29056,1	-29119,5	-29200,2
120	300	-29099,8	-29082,6	-29203,8	-29067,4	-29112,0	-29195,2
150	300	-29103,0	-29080,6	-29202,0	-29064,1	-29106,8	-29190,0
180	300	-29104,1	-29080,8	-29202,0	-29067,0	-29103,5	-29200,7
210	300	-29102,9	-29081,0	-29200,8	-29066,4	-29101,5	-29199,6
240	300	-29101,1	-29079,6	-29199,3	-29062,6	-29115,9	-29199,2
270	300	-29102,5	-29083,1	-29201,2	-29063,9	-29116,4	-29205,8
300	300	-29113,9	-29088,9	-29214,0	-29068,8	-29123,3	-29202,1
330	300	-29136,4	-29082,5	-29218,8	-29064,9	-29127,7	-29194,6
360	300	-29129,0	-29072,5	-29189,0	-29054,2	-29111,1	-29173,6
0	330	-29109,6	-29077,5	-29183,6	-29060,8	-29094,4	-29183,6
30	330	-29093,9	-29080,4	-29199,4	-29061,1	-29089,6	-29186,0
60	330	-29117,0	-29085,6	-29221,2	-29082,1	-29110,7	-29207,6
90	330	-29118,6	-29092,7	-29219,8	-29083,5	-29124,2	-29214,1
120	330	-29095,4	-29088,8	-29215,2	-29079,6	-29116,2	-29204,8
150	330	-29094,2	-29087,2	-29211,8	-29080,9	-29112,0	-29197,3
180	330	-29097,6	-29091,5	-29214,9	-29084,7	-29113,6	-29214,6
210	330	-29096,0	-29091,3	-29214,0	-29085,7	-29109,8	-29211,8
240	330	-29092,4	-29088,7	-29211,2	-29085,7	-29136,7	-29205,5
270	330	-29095,3	-29094,7	-29212,5	-29108,8	-29158,8	-29210,9
300	330	-29118,5	-29103,5	-29215,6	-29122,8	-29179,9	-29207,2
330	330	-29127,6	-29145,8	-29193,3	-29104,3	-29145,0	-29186,9
360	330	-29110,8	-29072,3	-29163,8	-29073,1	-29107,1	-29176,0
0	360	-29073,7	-29072,3	-29197,0	-22825,1	-29084,5	-29186,4
30	360	-29091,2	-29070,3	-29212,7	-22831,5	-29102,0	-29199,6
60	360	-29104,1	-29089,1	-29228,3	-29088,2	-29122,6	-29219,8
90	360	-29088,0	-29090,4	-29225,3	-29092,1	-29126,8	-29216,8
120	360	-29082,3	-29084,8	-29216,2	-29096,4	-29150,6	-29204,7
150	360	-29084,3	-29087,2	-29216,2	-29096,4	-29145,2	-29216,1
180	360	-29088,3	-29090,8	-29221,3	-29098,2	-29139,4	-29219,6
210	360	-29083,7	-29087,7	-29217,9	-29125,3	-29143,3	-29215,4
240	360	-29080,9	-29086,5	-29213,3	-29132,4	-29033,4	-29216,3
270	360	-29085,1	-29116,2	-29215,3	-29135,4	-29029,3	-29208,5
300	360	-29105,4	-29129,4	-29205,7	-29161,9	-29032,9	-29201,7
330	360	-22914,1	-29111,6	-29186,1	-29128,8	-28998,1	-29179,6
360	360	-28897,3	-29063,7	-29197,1	-29023,6	-29008,1	-29182,7

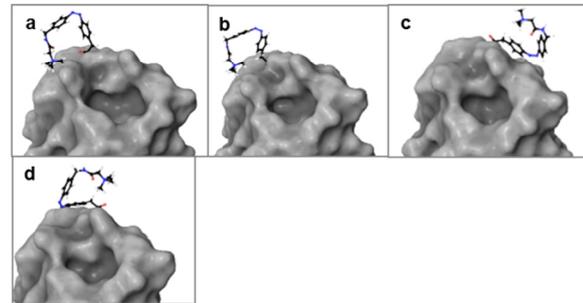
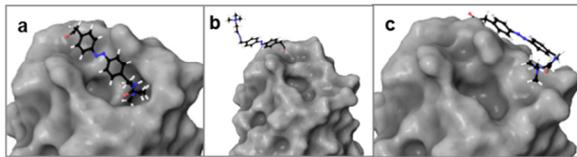
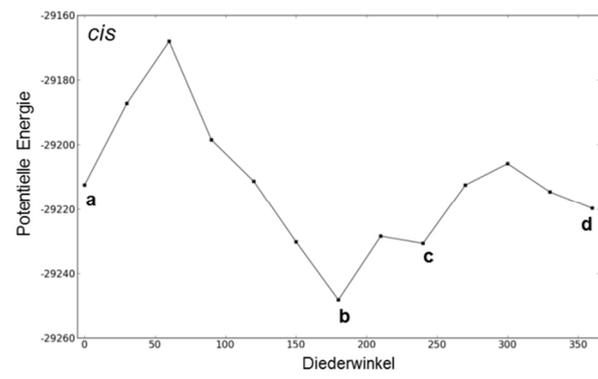
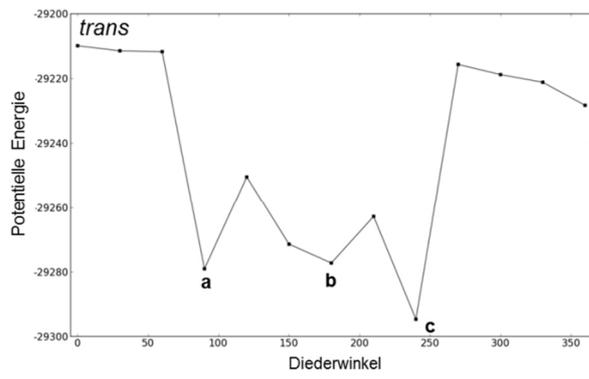
TYR48 closed gate-Struktur



TYR137 closed gate-Struktur



THR51 closed gate-Struktur



7 Literatur

- [1] J. D. Watson and F. H. C. Crick, A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [2] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero and H. Rüdiger, Chemical biology of the sugar code, *Chem.Bio.Chem.* **2004**, *5*, 740-764.
- [3] L.-X. Wang and B. G. Davis, Realizing the promise of chemical glycobiology, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3381-3394.
- [4] A. Varki, Omics: Account for the "dark matter" of biology, *Nature* **2013**, *497*, 565.
- [5] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon and T. Mustelin, Protein tyrosine phosphatases in human genome, *Cell* **2004**, *117*, 699-711.
- [6] A. Varki, Biological roles of oligosaccharides: all theories are correct, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- [7] S. Reitsma, D. W. Slaaf, H. Vink, M. A. M. J. v. Zandvoort and M. G. A. o. Egbrink, The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization, *Pflugers Arch.* **2007**, *454*, 345-359.
- [8] C. S. Alphonse and R. N. Rodseth, The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier, *Br. J. Anaesth.* **2014**, *69*, 777-784.
- [9] J. C. Rutledge, K. F. Ng, H. H. Aung and D. W. Wilson, Role of triglyceride-rich lipoproteins in diabetic nephropathy, *Nat Rev Nephrol* **2010**, *6*, 361-370.
- [10] T. K. Lindhorst, Oligosaccharides and glycoconjugates in recognition processes, In *Carbohydrate-modifying biocatalysts*, P. Grunwald(Ed.), Pan Stanford Publishing **2011**.
- [11] H. Lis and N. Sharon, Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
- [12] M. Ambrosi, N. R. Cameron and B. G. Davis, Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608.
- [13] T. K. Lindhorst, Ligands for FimH, In *Synthesis and Biological Applications of Glycoconjugates*, O. Renaudet and N. Spinelli, Bentham Science e-Books **2011**, 12-35.
- [14] M. J. Blaser, An endangered species in the stomach, *Sci. Am.* **2005**, *292*, 38-45.

-
- [15] R. J. Menaker and N. L. Jones, Fascination with bacteria-triggered cell death: the significance of Fas-mediated apoptosis during bacterial infection in vivo, *Micobes Infect.* **2003**, *5*, 1149-1158.
- [16] J. K. Savjani, A. K. Gajjar and K. T. Savjani, Mechanism of resistance: useful tool to design antibacterial agents for drug-resistant bacteria, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, *9*, 194-205.
- [17] J. Bouckaert and S. D. Knight, Structure, function and assembly of type 1 fimbriae, *Topics in Current Chemistry* **2009**, *288*, 67-107.
- [18] M. Hartmann and T. K. Lindhorst, The bacterial lectin FimH, a target for drug discovery – carbohydrate inhibitors of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3583-3609.
- [19] G. Waksman and S. J. Hultgren, Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 765-774.
- [20] M. Vetsch, C. Puorger, T. Spirig, U. Grauschopf, E. U. Weber-Ban and R. Glockshuber, Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst, *Nature* **2004**, *431*, 329-333.
- [21] D. Choudhury, X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*, *Science* **1999**, *285*, 1061-1066.
- [22] M. L. Connolly, Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids, *Science* **1983**, *221*, 709-713.
- [23] Maestro, Version 9.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2013**.
- [24] W. I. Weis, Structural basis of lectin-carbohydrate recognition, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441-473.
- [25] C.-S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman and S. J. Hultgren, Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection, *Mol. Microbiol.* **2002**, *44*, 903-915.
- [26] J. Bouckaert, J. Berglund, M. Schembri, E. D. Genst, L. Cools, M. Wuhler, 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 and H. D. Greve, Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin, *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 441-455.
- [27] K. Lang and J. W. Chin, Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764-4806.

- [28] Y. Takaoka, A. Ojida and I. Hamachi, Protein organic chemistry and applications for labeling and engineering in live-cell systems, *Angew. Chem. Int. Ed* **2013**, *52*, 4088-4106.
- [29] Y. Gong and L. Pan, Recent advances in bioorthogonal reactions for site-specific protein labeling and engineering, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 2123-2132.
- [30] C. D. Spicer and B. G. Davis, Selective chemical protein modification, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4740.
- [31] O. Boutureira and G. J. L. Bernardes, Advances in chemical protein modification, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174-2195.
- [32] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey and B. G. Davis, Facile conversion of cysteine and alkyl cysteines to dehydroalanine on protein surfaces: versatile and switchable access to functionalized proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052-5053.
- [33] Y. A. Lin, J. M. Chalker and B. G. Davis, Olefin cross-metathesis on proteins: investigation of allylic chalcogen effects and guiding principles in metathesis partner selection, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805-16811.
- [34] J. M. McFarland and M. B. Francis, Reductive alkylation of proteins using iridium catalyzed transfer hydrogenation, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490-13491.
- [35] T. Nakamura, Y. Kawai, N. Kitamoto, T. Osawa and Y. Kato, Covalent modification of lysine residues by allyl isothiocyanate in physiological conditions: plausible transformation of isothiocyanate from thiol to amine, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 536-542.
- [36] H. Ban, J. Gavriluk and C. F. Barbas, Tyrosine bioconjugation through aqueous ene-type reactions: a click-like reaction for tyrosine, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1523-1525.
- [37] H. Ban, M. Nagano, J. Gavriluk, W. Hakamata, T. Inokuma and C. F. Barbas, Facile and stable linkages through tyrosine: bioconjugation strategies with the tyrosine-click reaction, *Bioconj. Chem.* **2013**, *24*, 520-532.
- [38] M. Köhn and R. Breinbauer, The Staudinger ligation - a gift to chemical biology, *Angew. Chem. Int. Ed* **2004**, *43*, 3106-3116.
- [39] R. J. Pieters, D. T. S. Rijkers and R. M. J. Liskamp, Application of the 1,3-dipolar cycloaddition reaction in chemical biology: approaches toward multivalent carbohydrates and peptides and peptide-based polymers, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1181-1190.
- [40] E. Baslè, N. Joubert and M. Pucheault, Protein chemical modification on endogenous amino acids, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 213-227.
- [41] L. Wofsy, H. Metzger and S. J. Singer, Affinity labeling - a general method for labeling the active sites of antibody and enzyme molecules, *Biochemistry* **1962**, *1*, 1031-1039.

- [42] B. Baker, Factors in the design of active-site-directed irreversible inhibitors, *J. Pharm. Soc.* **1964**, 53, 347-364.
- [43] W. Lawson and H. Schramm, Modification of a methionine residue near the active site of chymotrypsin, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 2017-2018.
- [44] P. J. A. Weber and A. G. Beck-Sickinger, Comparison of the photochemically behaviour of four different photoactivatable probes, *J. Peptide Res.* **1997**, 49, 375-383.
- [45] M. Hashimoto and Y. Hatanaka, Recent progress in diazirine-based photoaffinity labeling, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2513-2523.
- [46] G. Chen, A. Heim, D. Riether, D. Yee, Y. Milgrom, M. A. Gawinowicz and D. Sames, Reactivity of functional groups on the protein surface: development of epoxide probes for protein labeling, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 8130-8133.
- [47] T. Hayashi and I. Hamachi, Traceless affinity labeling of endogenous proteins for functional analysis in living cells, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1460-1469.
- [48] S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura and I. Hamachi, Ligand-directed tosyl chemistry for protein labeling in vivo, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 341-343.
- [49] S. Tsukiji, H. Wang, M. Miyagawa, T. Tamura, Y. Takaoka and I. Hamachi, Quenched ligand-directed tosylate reagents for one-step construction of turn-on fluorescent biosensors, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 9046-9054.
- [50] S.-H. Fujishima, R. Yasui, T. Miki, A. Ojida and I. Hamachi, Ligand-directed acyl imidazole chemistry for labeling of membrane-bound proteins on live cells, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 3961-3964.
- [51] Y. Koshi, E. Nakata, M. Miyagawa, S. Tsukiji, T. Ogawa and I. Hamachi, Target-specific chemical acylation of lectins by ligand-tethered DMAP catalyts, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 245-251.
- [52] T. Tamura and I. Hamachi, Labeling proteins by affinity-guided DMAP chemistry, *Methods Mol. Biol.* **2015**, 1266, 229-242.
- [53] M. Kunishima, S. Nakanishi, J. Nishida, H. Tanaka, D. Morisaki, K. Hioki and H. Nomoto, Convenient modular method for affinity labeling (MoAL method) based on a catalytic amidation, *Chem. Commun.* **2009**, 5597-5599.
- [54] J. J. Chambers and R. H. Kramer, Light-activated ion channels for remote control of neural activity, *Methods Cell Biol.* **2008**, 90, 217-232.

- [55] A. Rullo, A. Reiner, A. Reiter, D. Trauner, E. Y. Isacoff and G. A. Woolley, Long wavelength optical control of glutamate receptor ion channels using a tetra-ortho-substituted azobenzene derivative, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14613-14615.
- [56] T. Weber, V. Chandrasekaran, I. Stamer, M. B. Thygesen, A. Terfort and T. K. Lindhorst, Switching of bacterial adhesion to a glycosylated surface by reversible reorientation of the carbohydrate ligand, *Angew. Chem. Int. Ed* **2014**, *53*, 14583-14586.
- [57] E. L. Vodovozova, Photoaffinity labeling and its application in structural biology, *Biochemistry (Moscow)* **2007**, *72*, 1-20.
- [58] D. Robinette, N. Neamati, K. Tomer and C. Borchers, Photoaffinity labeling combined with mass spectrometric approaches as a tool for structural proteomics, *Expert Rev. Proteomics* **2006**, *3*, 399-408.
- [59] M. Walter, M. Wiegand and T. K. Lindhorst, Synthesis of cluster mannosides carrying a photolabile diazirine group, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 719-728.
- [60] T. K. Lindhorst, M. Märten, A. Fuchs and S. D. Knight, En route to photoaffinity labeling of the bacterial lectin FimH, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 810-822.
- [61] M. Wiegand and T. K. Lindhorst, Synthesis of photoactive-alpha-mannosides and mannosyl peptides and their evaluation for lectin labeling, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4841-4851.
- [62] M. Märten, Mono- und bifunktionelle mannosidische Photoaffinitätsliganden für das bakterielle Lektin FimH : Design, Synthese und Anwendung, *Dissertation* **2010**, CAU Kiel.
- [63] J. H. Harvey and D. Trauner, Regulating enzymatic activity with a photoswitchable affinity label, *Chem. Biochem.* **2008**, *9*, 191-193.
- [64] H. Wang, Y. Koshi, D. Minato, H. Nonaka, S. Kiyonaka, Y. Mori, S. Tsukiji and I. Hamachi, Chemical cell-surface receptor engineering using affinity-guided multivalent organocatalysts, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12220-12228.
- [65] T. Hayashi, Y. Yasueda, T. Tamura, Y. Takaoka and I. Hamachi, Analysis of cell-surface receptor dynamics through covalent labeling by catalyst-tethered antibody, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5372-5380.
- [66] Z. Song, Y. Takaoka, Y. Kioi, K. Komatsu, T. Tamura, T. Miki and I. Hamachi, Extended affinity-guided DMAP chemistry with finely-tuned acyl donor for intracellular FKBP12 labeling, *Chem. Lett.* **2015**, *44*, 333-335.
- [67] T. Hayashi, Y. Sun, T. Tamura, K. Kuwata, Z. Song, Y. Takaoka and I. Hamachi, Semisynthetic lectin-dimethylaminopyridine conjugates for labeling and profiling glycoproteins on live cell surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12252-12258.

- [68] L. Dubinsky, B. P. Krom and M. M. Meijler, Diazirine based photoaffinity labeling, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 554-570.
- [69] F. Kotzyba-Hilbert, I. Kapfer and M. Goelder, Neue Entwicklungen in der Photoaffinitätsmarkierung
Angew. Chem. **1995**, *107*, 1391-1408.
- [70] J. Brunner, H. Senn and F. M. Richards, 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirin - A new carbene generating group for photolabeling reagents, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.
- [71] Y. Hatanaka, M. Hashimoto, H. Kurihara, H. Nakayama and Y. Kanaoka, A novel family of aromatic diazirines for photoaffinity labeling, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 383-387.
- [72] M. Nassal, 4-(1-Azi-2,2,2-trifluoroethyl)benzoic acid, a high photolabile carbene generating label readily fixable to biochemical agents, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1510-1523.
- [73] Y. Hatanaka, M. Hashimoto and Y. Kanaoka, A novel biotinylated heterobifunctional cross-linking reagent bearing an aromatic diazirine, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1367-1373.
- [74] Y. Hatanaka, H. Nakayama and Y. Kanaoka, An improved synthesis of 4-[3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]benzoic acid for photoaffinity labeling, *Heterocycl. Chem.* **1993**, *35*, 997-1004.
- [75] O. Sperling, A. Fuchs and T. K. Lindhorst, Evaluation of the carbohydrate recognition domain of the bacterial adhesin FimH: design, synthesis and binding properties of mannoside ligands, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3913-3922.
- [76] N. Firon, S. Ashkenazi, D. Mirelman, I. Ofek and N. Sharon, Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells, *Infect. Immun.* **1987**, *55*, 472-476.
- [77] Tripos Inc. SYBYL, Version 6.9, Tripos Inc., St. Louis, **2002**.
- [78] P. Furet, A. Sele and N. C. Cohen, 3D molecular lipophilicity potential profiles: a new tool in molecular modeling, *J. Mol. Graphics* **1988**, *6*, 182-189.
- [79] W. Heiden, G. Moeckel and J. Brickmann, A new approach to analysis and display of local lipophilicity/hydrophilicity mapped on molecular surfaces, *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **1993**, *7*, 503-514.
- [80] S.-Y. Han and Y.-A. Kim, Recent development of peptide coupling reagents, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [81] O. Westphal and H. Feier, Darstellung künstlicher Antigene mit determinanten Zuckergruppen, II. Mitteil.: Synthese der *p*-Aminophenyl-*O*-alpha-glykoside von L-Fucose, L-Rhamnose, D-Galaktose und D-Mannose, *Chem. Ber.* **1955**, *89*, 582-588.

- [82] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder and P. Smith, A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules, *Polym. J.* **1985**, *17*, 117-132.
- [83] E. Merino, Synthesis of azobenzenes: the coloured pieces of molecular materials, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3835-3853.
- [84] H. M. DhammikaBandara and S. C. Burdette, Photoisomerization in different classes of azobenzene, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809-1825.
- [85] W. Szymanski, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema and B. L. Feringa, Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 6114-6178.
- [86] J. Bredenbeck, J. Helbing, A. Sieg, T. Schrader, W. Zinth, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveit and P. Hamm, Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6452-6457.
- [87] A. Goulet-Hanssens and C. J. Barrett, Photo-control of biological systems with azobenzene polymers, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2013**, *51*, 3058-3070.
- [88] A. A. Beharry and G. A. Woolley, Azobenzene photoswitches for biomolecules, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4422-4437.
- [89] Glide, Version 6.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2013**.
- [90] MacroModel, Version 10.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2013**.
- [91] LigPrep, Version 2.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2013**.
- [92] V. Chandrasekaran, E. Johannes, H. Kobarg, F. Sönnichsen and T. K. Lindhorst, Synthesis and photochromic properties of configurationally varied azobenzene glycosides, *ChemistryOpen* **2014**, *3*, 99-108.
- [93] V. Chandrasekaran, K. Kolbe, F. Beiroth and T. K. Lindhorst, Synthesis and testing of the first azobenzene mannobioside as photoswitchable ligand for the bacterial lectin FimH, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 223-233.
- [94] A. R. O. Venning, P. T. Bohan and E. J. Alexanian, Palladium-catalyzed, ring-forming aromatic C-H alkylations with unactivated alkyl halides, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3731-3734.
- [95] A. K. Yudin, J. P. Chiang, H. Adolfsson and C. Coperet, Olefin epoxidation with bis(trimethylsilyl) peroxide catalyzed by inorganic oxorhenium derivatives. Controlled release of hydrogen peroxide, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4713-4718.

- [96] L. Ulysse and J. Chmielewski, The synthesis of a light-switchable amino acid for inclusion into conformationally mobile peptides, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *4*, 2145-2146.
- [97] J. Juodaityte and N. Sewald, Synthesis of photoswitchable amino acids based on azobenzene chromophores: building blocks with potential for photoresponsive biomaterials, *J. Biotech.* **2004**, *112*, 127-138.
- [98] A. Aemissegger, V. Kräutler, W. F. v. Gunsteren and D. Hilvert, A photoinducible beta-haripin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2929-2936.
- [99] A. Y. Cernyak, G. V. M. Sharma, L. O. Kononov, P. R. Krishna, A. B. Levinsky and N. K. Kochetkov, 2-Azidoethyl glycosides: glycosides potentially useful for the preparation of neoglycoconjugates, *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 303-309.
- [100] R. Roy and J. M. Kim, Amphiphilic *p*-*tert*-butylcalix[4]arene scaffolds containing exposed carbohydrate dendrons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 369-372.
- [101] S. Xu, I. Held, B. Kempf, H. Mayr, W. Steglich and H. Zipse, The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols - a mechanistic study (DMAP = 4-(dimethylamino)pyridine), *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4751-4757.
- [102] S. Bhattacharya and K. Snehalatha, Dialkylaminopyridine catalysed esterolysis of *p*-nitrophenyl alkanoates in different cationic microemulsions, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1996**, *2*, 2021-2025.
- [103] M. Hartmann, A. K. Horst, P. Klemm and T. K. Lindhorst, A kit for the investigation of live *Escherichia coli* cell adhesion to glycosylated surfaces, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 330-332.
- [104] T. Ry, The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509-544.
- [105] M. H. Davey, V. Y. Lee, R. D., Miller and T. J. Marks, Synthesis of aryl nitroso derivatives by *tert*-butyl hypochlorite oxidation in homogeneous media. Intermediates for the preparation of high-hyperpolarizability chromophore skeletons, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4976-4979.
- [106] K. Haghbeen and E. W. Tan, Facile synthesis of catechol azo dyes, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4503-4505.
- [107] C. J. Byrne, D. A. R. Happer, M. P. Hartshorn and H. K. J. Powell, The electronic effect of the phenylazo and *t*-butylazo groups *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1987**, *6*, 1649-1653.
- [108] J. H. Harvey, B. K. Butler and D. Trauner, Functionalized azobenzenes through cross-coupling with organotrifluoroborates, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *48*, 1661-1664.

- [109] S. R. Chemler, D. Trauner and S. J. Danishefsky, The B-alkyl Suzuki-Miyaura cross coupling reaction: development, mechanistic study, and applications in natural product synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed* **2001**, *40*, 4544-4568.
- [110] I. Stamer, *Masterarbeit* **2014**, CAU Kiel.
- [111] K. Biemann, Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure, *Biol. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 99-111.
- [112] A. Viegas, J. Manso, F. L. Nobrega and E. J. Cabrita, Saturation-transfer difference (STD) NMR: a simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding, *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 990-994.
- [113] H. Schenck, P. W. Lenkowski, I. Choudhury-Mukherjee, S.-H. Ko, J. P. Stables, M. K. Patel and M. L. Brown, Design, synthesis and evaluation of novel hydroxylamides as orally available anticonvulsants, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 979-993.
- [114] M. Nassal, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1510-1523.
- [115] B. Kunz, Kohlenhydrat-Pinzetten: Synthese photoaktivierbarer Pseudoamidglycoside für die H-Brücken-unterstützte Photomarkierung, *Dissertation* **2011**, CAU Kiel.
- [116] M. Hu, L. Li, H. Wu, Y. Su, P.-Y. Yang, M. Uttamchandani, Q.-H. Xu and S. Q. Yao, Multicolor, one- and two-photon imaging of enzymatic activities in live cells with fluorescently quenched activity-based probes (qABPs), *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12009-12020.
- [117] R. I. Dowell, C. J. Springer, D. H. Davies, E. M. Hadley, P. J. Burke, F. T. Boyle, R. G. Melton, T. A. Connors, D. C. Blakey and A. B. Mauger, New mustard prodrugs for antibody-directed enzyme prodrug therapy: alternatives to the amide link, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1100-1105.
- [118] A. Mouro, M. A. Kienzler, M. R. Banghart, T. Fehrentz, F. M. E. Huber, M. Stein, R. H. Kramer and D. Trauner, Tuning photochromic ion channel blockers, *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 536-543.
- [119] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer and G. Klebe, A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm, *Journal of Molecular Biology* **1996**, *261*, 470-489.
- [120] M. Rarey, B. Kramer and T. Lengauer, Multiple automatic base selection: protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention, *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **1997**, *11*, 369-384.
- [121] B. Kramer, G. Metz, M. Rarey and T. Lengauer, Ligand docking and screening with FlexX, *Med. Chem. Res.* **1999**, *9*, 463-478.

- [122] A. Fuchs, Design und Synthese von Liganden für das Lektin FimH, *Dissertation* **2005**, CAU Kiel.
- [123] J. Schmidt-Lassen, Synthese, biophysikalische und computer-gestützte Untersuchungen von amphiphilen Zuckerkonjugaten zur Erforschung der Glycokalyx, *Dissertation* **2013**, CAU Kiel.
- [124] P. S. Charifson, J. J. Corkery, M. A. Murcko and W. P. Walters, Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins, *Journal of medicinal chemistry* **1999**, *42*, 5100-5109.
- [125] R. D. Clark, A. Strizhev, J. M. Leonard, J. F. Blake and J. B. Matthew, Consensus scoring for ligand/protein interactions, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2002**, *20*, 281-295.
- [126] W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives, OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657-1666.
- [127] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell and J. Tirado-Rives, Development and testing of the OPLS all-atom force energetics and properties of organic liquids *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225-11236.
- [128] D. Shivakumar, J. Williams, Y. Wu, W. Damm, J. Shelley and W. Sherman, Prediction of absolute solvent free energies using molecular dynamics free energy perturbation and the OPLS force field, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1509-1519.
- [129] J. Jensen, Introduction to computational chemistry, In, Wiley **2007**.
- [130] C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell and P. A. Kollman, A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.
- [131] T. Steinbrecher, Untersuchungen von Protein-Ligand Wechselwirkungen mit Hilfe von Computersimulationen, *Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau, **2005**.
- [132] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, D. E. Shaw, M. Shelley, J. K. Perry, P. Francis and P. S. Shenkin, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749.

[133] T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, H. S. Beard, L. L. Frye, W. T. Pollard and J. L. Banks, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750-1759.

[134] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, D. E. Shaw, M. Shelley, J. K. Perry, P. Francis and P. Shenkin, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749.

9 Danksagung

Bei Frau Prof. THISBE K. LINDHORST möchte ich mich sehr für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis, für die interessante Themenstellung und für die gute Zusammenarbeit bedanken, die stets von sehr viel Freiraum, Vertrauen und Freundlichkeit geprägt war. Vielen Dank für die großzügige Unterstützung und Förderung in den letzten Jahren!

Bei Prof. FRANK SÖNNICHSEN möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats und für die freundliche Unterstützung bei den NMR-Experimenten bedanken.

Ein sehr großer Dank geht an meine Kooperationspartner TOMAS KOUDELKA und TORSTEN OVERATH aus der Arbeitsgruppe THOLEY. Ganz besonders an TOM, danke für die nette und effektive Zusammenarbeit und auch für die gute Versorgung mit Kaffee, Keksen und Eis. Dein Einsatz hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen!

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Zusammenarbeit und die Hilfe bei diversen Problemen. Besonders erwähnen möchte ich dabei die Mitarbeiter der spektroskopischen Abteilung GITTA KOHLMAYER-YILMAZ, MARION HÖFTMANN, HOLGER FRANZEN, DIRK MEYER, ROLF SCHMIED und SILKE RÜHL. Nicht zu vergessen einen großen Dank an CHRISTINE HAUG, die mit ihrer uneingeschränkt hilfsbereiten und freundlichen Art vieles vereinfacht hat.

Großer Dank gilt ebenso ELWIRA KLIMA-BARCZAK für die wertvolle Hilfe bei der Analytik dieser Arbeit, für ihre stetige Unterstützung und ihre herzliche Art.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises LINDHORST möchte ich mich für die gemeinsame Zeit bedanken, die geprägt war von einer außerordentlichen Hilfsbereitschaft bei chemischen und nicht-chemischen Problemen. Besonders aber auch die vielen Erlebnisse neben der Arbeit und die gewonnen Freundschaften haben die Jahre sehr bereichert. Besonders großen Dank an:

- CHRISTIAN MÜLLER, danke für das Korrekturlesen dieser Arbeit, die vielen Ablenkungen, das ein oder andere Feierabendbier, nette Gespräche und deine Freundschaft!
- ANNE MÜLLER, danke für die Zeit im schönsten Labor, für die vielen gemeinsamen Erlebnisse und deine Freundschaft. Außerdem bedanke ich mich für viele hilfreiche Tipps und das Korrekturlesen!

- ANNA CIUK, danke für das schnelle und gute Korrekturlesen in den letzten Stunden vor der Abgabe! Das Arbeiten im Labor und auch andere Erlebnisse mit dir haben immer sehr viel Spaß gemacht. Danke, dass ich dich kennenlernen durfte!
- LENA FERNANDO, danke für viele lustige Stunden und deine mitreißende, unkomplizierte Art!
- VIJAYANAND CHANDRASEKARAN, danke, dass ich dich in der Zeit meiner Doktorarbeit kennenlernen durfte und danke für viele schöne Erinnerungen und *friday beers*.

Außerdem danke ich KATHARINA KOLBE, CLAUDIA FESSELE, JULIA HAIN und FRANZISKA REISE für das Korrekturlesen, die Unterstützung jeglicher Art und viele nette Unternehmungen.

Danke auch an meine fleißigen Bachelorstudenten MAXIMILIANE LANDSMANN und HENDRIK RAPP sowie an meine F3-Praktikanten INSA STAMER und FRANZISKA REISE! Ihr alle habt maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Außerhalb des Arbeitskreises möchte ich meinen Freunden aus dem Studium für die vielen gemeinsamen Momente danken, wobei ein ganz besonders großer Dank an BRITTA HESSELER geht. Danke für die großartige Unterstützung besonders während der letzten Wochen und für deine Freundschaft!

Danke an meine Familie, besonders an meine Eltern HOLGER und MARINA BEIROTH für die Unterstützung während der Doktorarbeit. Ohne sie wäre dieser Weg sicherlich nicht möglich gewesen.

Außerdem möchte ich JANNES REIMERS danken. Danke für die Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit und dein liebevolles, unkompliziertes Wesen. „*It's so simple, you complete me*“.