

Entwicklung von Markierungsstrategien für smFRET und PAL am Beispiel der DENV-NS2B-NS3-Protease und ihrer Inhibitoren



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Andrea Gellert
geboren in Suhl

Mainz, Juli 2020

- D77 -

Mainzer Dissertation

Dekan:

[REDACTED]

Erster Berichterstatter:

[REDACTED]

Zweiter Berichterstatter:

[REDACTED]

Mündliche Prüfung:

28.08.2020

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2016 bis Juli 2020
am Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften (IPBW)
der Johannes Gutenberg-Universität
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] angefertigt.

Erklärung der Urheberschaft

Hiermit erkläre ich Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Es wurden nur die ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel in dieser Arbeit verwendet. Ich versichere, dass ich wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut aus anderen Werken als solches gekennzeichnet habe. Die Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung eingereicht. Zudem wurden bisher weder die Arbeit noch Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Mainz, 08.07.2020

Andrea Gellert

FÜR MEINE FAMILIE

Zusammenfassung

Das sich global ausbreitende Dengue-Virus (DENV) stellt besonders für Bevölkerungsgruppen der Subtropen und Tropen eine große Herausforderung dar, da es bis heute keine spezifische medikamentöse Therapie gibt. Eine entscheidende Rolle bei der Virusreplikation spielt die DENV-NS2B-NS3-Protease, welche ein vielversprechender Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente ist. Ein möglicherweise therapeutisch nutzbarer Angriffspunkt an der Protease ist eine allosterische Bindetasche, deren Funktion und Bedeutung noch unbekannt ist. Für eine erfolgreiche Wirkstoffentwicklung ist dabei die Aufklärung des genauen Bindemodus eines nicht-kompetitiven Inhibitors durch Co-Kristallisation oder Photoaffinitätsmarkierung unerlässlich. Ein tiefgründiges Verständnis der Kinetik der Liganden-Bindung und den Einfluss der bekannten offenen und geschlossenen Konformationen der DENV-NS2B-NS3-Protease kann zudem die rationale Wirkstoffentwicklung verbessern.

In dieser Arbeit wurden die Grundvoraussetzungen geschaffen, um Konformationsdynamiken sowie Assoziations- und Dissoziationskonstanten von kompetitiven und nicht-kompetitiven Inhibitoren mittels Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energie-Transfer (smFRET) zu beschreiben. Hierfür wurden in einem ersten Projekt verschiedene Cysteinmutanten der DENV-NS2B-NS3-Protease (G14C, S79C, S79C-G14C, S79C-S158C) selektiv mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Durch Optimierung der Farbstoffmarkierung an der Wildtyp-Protease konnte die unspezifische Farbstoffmarkierung soweit verringert werden, dass diese die smFRET-Messungen nicht beeinflussten. Studien der Kooperationspartner bestätigten unterschiedliche Konformationen der Protease in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors (geschlossen) und eines nicht-kompetitiven Inhibitors (offen). In einem assoziierten Projekt wurden zudem nicht-kompetitive Inhibitoren mit funktionellen Gruppen modifiziert (Alkine, Carbonsäuren, Amine und Thiole), welche eine effiziente Umsetzung mit dem Fluoreszenzfarbstoff ermöglichen. Mittels Thiol-Maleimid-Reaktion gelang es, einen farbstoffmarkierten nicht-kompetitiven Inhibitor zu entwickeln.

Zur Aufklärung des tatsächlichen Bindemodus nicht-kompetitiver Inhibitoren wurden des Weiteren Liganden mit einer photoreaktiven Gruppe synthetisiert und bezüglich der inhibitorischen Eigenschaften sowie der kinetischen Eigenschaften nach UV-Bestrahlung untersucht. Mit diesen Liganden können Photoaffinitätsmarkierungen an der DENV-NS2B-NS3-Protease durchgeführt werden, um zu evaluieren, welche Aminosäuren der allosterischen Bindetasche an der Inhibitor-Interaktion beteiligt sind.

Abstract

The globally expanding dengue virus (DENV) represents a major challenge, especially for populations in subtropical and tropical regions, as there is no specific drug therapy available to the present day. The DENV-NS2B-NS3-protease plays a key role in viral replication and is a promising target for the development of new drugs. One approach to influence the protease is the interaction of inhibitors with an allosteric binding pocket, of which the original function and relevance is still unknown. Determination of the exact binding mode of a non-competitive inhibitor by co-crystallization or photoaffinity labeling is essential for successful drug development. A profound understanding of ligand-binding kinetics and the influence of the known open and closed DENV-NS2B-NS3 protease conformation can also accelerate rational drug development.

In this thesis, the prerequisites to describe conformational dynamics as well as association and dissociation dynamics of competitive and non-competitive inhibitors by single molecule Förster Resonance Energy Transfer (smFRET), were created. In a first project, different cysteine mutants of the DENV-NS2B-NS3 protease (G14C, S79C, S79C-G14C, S79C-S158C) were selectively labelled with fluorescent dyes. Non-specific labeling with the fluorescent dye was reduced to a level where it did not affect smFRET measurements, by optimizing labeling conditions using the wildtype protease. Studies of the collaboration partners confirmed different conformations of the protease in the presence of a competitive inhibitor (closed) and a non-competitive inhibitor (open). In an associated project, non-competitive inhibitors were modified with functional groups (alkynes, carboxylic acids, amines and thiols) facilitating an efficient reaction with the fluorescent dye. A dye-labelled non-competitive inhibitor was developed utilizing a thiol maleimide reaction.

In order to determine the actual binding mode of non-competitive inhibitors, ligands with a photoreactive group were synthesized and investigated with regard to their inhibitory and kinetic properties after UV irradiation. With these ligands in hand, photoaffinity labeling to the DENV-NS2B-NS3 protease can be performed to evaluate which amino acids of the allosteric binding are involved in inhibitor-protease-interaction.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	XI
Abstract.....	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XXI
I Allgemeiner Teil	1
1 Einleitung.....	1
1.1 Dengue.....	1
1.1.1 Dengue Fieber.....	1
1.1.1.1 Krankheitsbild.....	2
1.1.1.2 Therapie.....	3
1.1.2 Dengue-Virus.....	4
1.1.2.1 Das Genom und der Infektionszyklus von Flaviviren	4
1.1.3 DENV-NS2B-NS3-Protease.....	6
1.1.3.1 Struktur und katalytische Aktivität.....	7
1.1.3.2 Allosterische Binderegion.....	8
1.1.3.3 Konformationen.....	10
1.1.3.4 Inhibitoren.....	11
1.2 Fluoreszenzspektroskopische Methoden.....	16
1.2.1 Grundlagen und Konzepte.....	16
1.2.1.1 Fluoreszenz und Fluorophore.....	16
1.2.1.2 Fluoreszenzanisotropie	18
1.2.1.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenz.....	19
1.2.2 Methoden und Anwendung.....	19
1.2.2.1 Einzelmolekülspektroskopie	19
1.2.2.2 Konfokale Mikroskopie.....	20
1.2.2.3 Förster-Resonanz-Energie-Transfer	22
1.2.2.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	24
1.3 Photoaffinitätsmarkierung	27
1.3.1 Photoaffinitätsproben.....	28

1.3.2	PAL zur Identifizierung von Proteinen, Rezeptoren und Ligandenbindestellen.....	32
2	Motivation und Zielsetzung.....	37
3	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1	Fluoreszenzmarkierung	41
3.1.1	Fluoreszenzmarkierungen der DENV-NS2B-NS3-Protease.....	43
3.1.1.1	Voruntersuchungen.....	43
3.1.1.2	Einfach markierte DENV2-NS2B-NS3-Proteasen.....	44
3.1.1.3	Optimierung der Fluoreszenzmarkierung.....	50
3.1.1.4	Doppelt markierte DENV2-NS2B-NS3-Proteasen.....	57
3.1.1.5	Enzymkinetik der markierten DENV2-NS2B-NS3-Proteasen.....	71
3.1.2	Fluoreszenzmarkierung des Inhibitors.....	77
3.1.2.1	Herstellung der Modellsubstanzen.....	80
3.1.2.2	Modifizierung des Inhibitors 8.....	82
3.1.2.3	Modifizierung der Inhibitoren 35 und 36.....	88
3.1.2.4	Modifizierung des Inhibitors 37	89
3.1.2.5	Modifizierung neuer Inhibitoren.....	91
3.1.2.6	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.....	105
3.1.2.7	Fluoreszenzmarkierung Thiol-funktionalisierter Inhibitoren.....	109
3.2	Photoaffinitätsmarkierung (PAL).....	116
3.2.1	Synthese der Inhibitoren mit photoreaktiver Gruppe.....	118
3.2.2	Testung der synthetisierten Inhibitoren mit photoreaktiver Gruppe	119
3.2.3	Untersuchung der photochemischen Reaktivität.....	122
3.2.4	Photoaffinitätsmarkierung der NS2B-NS3-Protease.....	126
3.2.5	Massenspektrometrische Analyse der NS2B-NS3-Proteasen.....	127
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	131
II	Experimenteller Teil	139
5	Geräte.....	139
6	Software	140
7	Biochemischer Teil	141

7.1	Materialien	141
7.1.1	Medien, Puffer und Lösungen	141
7.1.2	Marker und Ladepuffer.....	142
7.1.3	Fluoreszenzfarbstoffe	142
7.1.4	Kits und Verbrauchsmaterialien.....	143
7.1.5	DENV-NS2B-NS3_Mutanten.....	143
7.1.6	Enzyme und Polymerasen	144
7.1.7	Antibiotika	144
7.1.8	<i>E. coli</i> Stämme	144
7.1.9	Plasmide und Vektoren	145
7.1.10	Oligonukleotide	145
7.2	Allgemeine Methoden.....	145
7.2.1	Molekularbiologische Methoden	145
7.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	145
7.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	145
7.2.1.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	146
7.2.1.4	Reinigung der Plasmid-DNA	146
7.2.1.5	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	146
7.2.1.6	Sequenzierung.....	146
7.2.2	Biochemische Methoden.....	147
7.2.2.1	Proteinexpression.....	147
7.2.2.2	Bakterienaufschluss	147
7.2.2.3	Proteinreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie.....	147
7.2.2.4	Proteinreinigung mittels Gel-Permeations-Chromatographie.....	148
7.2.2.5	Fluoreszenzmarkierungen	148
7.2.2.6	SDS-PAGE	149
7.2.3	Fluoreszenzdetektion.....	150
7.2.3.1	Typhoonscanner	150
7.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration und Markierungseffizienz	150

7.3	Durchgeführte Experimente	150
7.3.1	Fluoreszenzmarkierung der DENV3-WT-Protease.....	151
7.3.2	Vektorkonstruktion zur Herstellung der DEN2-NS2B-NS3-G14C-Protease.....	151
7.3.3	Expression und Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-G14C-Protease.....	152
7.3.4	Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-S79C-Protease	155
7.3.5	Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease	156
7.3.6	Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C-Protease	156
7.3.7	Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-WT-Proteasen	158
8	Fluorimetrischer Assay	165
8.1	Bestimmung der K_M -Werte.....	165
8.2	Bestimmung der IC_{50} -Werte.....	165
8.3	Bestimmung des Korrekturfaktors	166
9	Synthetischer Teil.....	167
9.1	Allgemeine Methoden und Messgeräte	167
9.1.1	Lösemittel und Chemikalien	167
9.1.2	Chromatographie	167
9.1.2.1	Dünnschichtchromatographie.....	167
9.1.2.2	Präparative Dünnschichtchromatographie.....	168
9.1.2.3	Säulenchromatographie.....	168
9.1.2.4	Analytische HPLC.....	168
9.1.2.5	Präparative HPLC	169
9.1.3	NMR-Spektroskopie	169
9.1.4	Massenspektrometrie.....	169
9.1.5	Infrarot-Spektroskopie	170
9.1.6	Schmelzpunktbestimmung.....	170
9.1.7	Polarimetrie.....	170
9.1.8	Photochemische Reaktion	170

9.2	Allgemeine synthetische Methoden	171
9.2.1	TBTU-Kupplungen.....	171
9.2.2	Entfernung der Boc-Schutzgruppe.....	171
9.2.3	Entfernung der Trityl-Schutzgruppe.....	171
9.2.4	Entfernung der Methylschutzgruppe.....	172
9.3	Synthetisierte Verbindungen	173
9.3.1	Herstellung allgemeiner Synthesebausteine.....	173
9.3.2	Synthese der Modellsubstanzen	178
9.3.3	Vorschriften für modifizierte Inhibitoren	182
9.3.4	Vorschrift für einen fluoreszenzmarkierten Inhibitor	224
9.3.5	Verbindungen für Photoaffinitätsmarkierungen.....	225
10	Literaturverzeichnis.....	237
11	Anhang	243
11.1	SDS-PAGE nach Fluoreszenzmarkierung.....	243
11.2	Rohdaten Photoaffinitätsmarkierung	244

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
Ala	Alanin
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aq.	wässrig
Äq.	Äquivalente
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATR	<i>attenuated total reflection</i> , abgeschwächte Totalreflexion
A β	Amyloid- β -Protein
BBr ₃	Borontribromid
Boc	<i>tert</i> -Butylcarbonyl
CH	Cyclohexan
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CID	<i>collision induced dissociation</i> , kollisionsinduzierte Dissoziation
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CuAAC	Kupfer(I) katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Cys	Cystein
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Duplett vom Duplett
DENV	Dengue-Virus
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	Ethylacetat (Essigsäureethylester)
ET	Energietransfer
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethylether
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i> , Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer

ges.	gesättigt
Glu	Glutamat
Gly	Glycerin
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
Grd.	Gradient
GSM	γ -Sekretase-Modulatoren
GSI	γ -Sekretase-Inhibitoren
HAc	Eisessig
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
His	Histidin
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOBt	1-Hydroxybenzo[d]triazol
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HTS	<i>high throughput screening</i> (Hochdurchsatzscreening)
HTVS	<i>high throughput virtuel screening</i> (virtuelles Hochdurchsatzscreening)
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IC	<i>internal conversion</i>
IMAC	immobilisierte Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot(spektroskopie)
ISC	<i>intersystem crossing</i>
<i>J</i>	Kupplungskonstante
konz.	konzentriert
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie mit angeschlossenem Massenspektrometer
LLE	Lipophile Ligandeneffizienz
LM	Lösemittel
Lys	Lysin
m	Multiplett
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MWCO	<i>molecular wight cut off</i>
nACh	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	<i>nickel nitrilotriacetic acid</i> , Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	<i>photoaffinity labeling</i> , Photoaffinitätsmarkierung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PE	Petrolether

PEG	Polyethylenglykol
PG	photoreaktive Gruppe
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
präp.	präparativ
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
smFRET	<i>single molecule förster resonance energy transfer</i> , Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energie-Transfer
sog.	sogenannte
SR	Schwingungsrelaxation
t	Triplett
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium- tetrafluoroborat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ün	über Nacht
UV	Ultraviolettstrahlung
vgl.	Vergleiche
VIS	Visuelles Spektrum
WT	Wildtyp
WW	Wechselwirkung
ZIKV	Zika-Virus

I Allgemeiner Teil

1 Einleitung

1.1 Dengue

1.1.1 Dengue Fieber

Das zu den vernachlässigten Krankheiten zählende Dengue-Fieber verzeichnete in den letzten 50 Jahren einen 30-fachen Anstieg der weltweiten Inzidenz. Laut der *Weltgesundheitsorganisation* WHO lebt die Hälfte der Weltbevölkerung in Gebieten, in denen das Dengue Fieber endemisch vorkommt, und jährlich treten 50–100 Millionen neue Infektionen auf, die symptomatisch verlaufen.^[1] Werden zusätzlich die symptomfreien Fälle berücksichtigt, sind es bis zu 390 Millionen Neuinfektionen pro Jahr. Die arbovirale Erkrankung wird primär durch die Stechmücke *Aedes aegypti* vor allem in den Tropen und Subtropen übertragen. Der zweithäufigste, jedoch weniger effiziente Vektor, *Aedes albopictus*, hat sich zudem in Nordamerika und in europäischen Regionen ausgebreitet.^[1-3] Erstmalige Erwähnung von Krankheitssymptomen, die denen einer Dengue-Infektion entsprechen, wurden in den Jahren 1779/1780 verzeichnet, wobei es zu epidemischen Ausbrüchen unter anderem in Ägypten und Philadelphia kam.^[4] Derzeit leben ca. 3.9 Milliarden Menschen in rund 128 Ländern in Dengue-Risikogebieten (**Abbildung 1.1**).

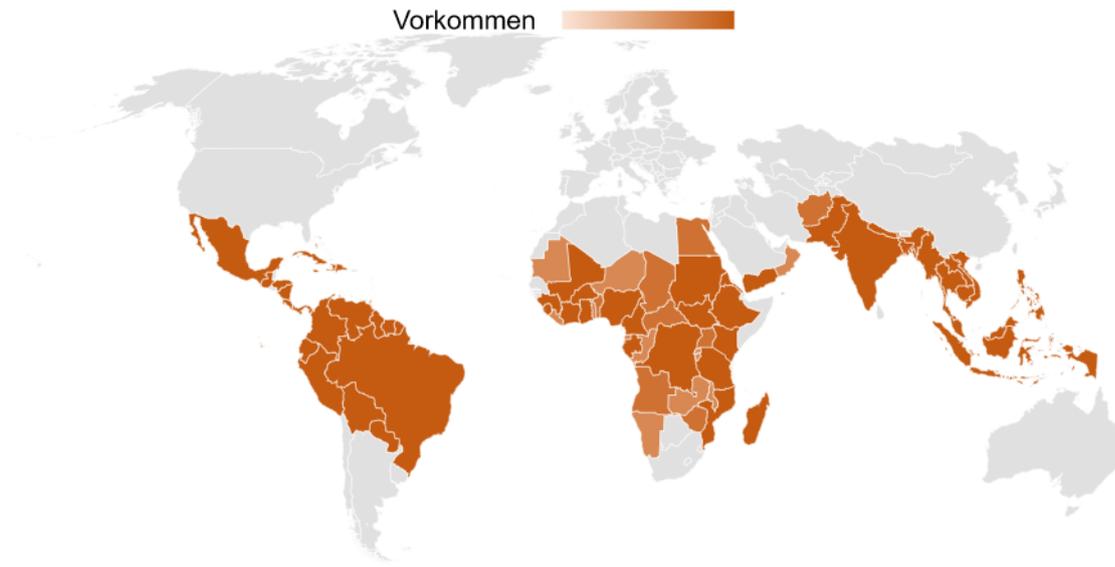


Abbildung 1.1: Globale Ausbreitung des DENV. Die Farbabstufungen spiegeln das Vorkommen in den Regionen wieder (dunkelrot entspricht dem höchsten Vorkommen). Die Grafik wurde mit Microsoft PowerPoint in Anlehnung an GUZMAN *et al.* erstellt.^[5]

Ursächlich für die zunehmende Ausbreitung der Risikogebiete sind neben dem Klima vor allem die Urbanisierung sowie der mit der Globalisierung einhergehende verstärkte Reiseverkehr.^[4,6] Die ersten zwei in Europa (Südfrankreich) autochthon auftretenden Fälle wurden 2010 registriert.^[7] 2018 gab es in Deutschland laut Robert Koch-Institut 613 registrierte, jedoch im Ausland erworbene Infektionsfälle.^[8] Allerdings wurden in Deutschland bereits Populationen von *Ae. albopictus* dokumentiert, denen eine Überwinterung in Südwestdeutschland gelang.^[9,10] Für eine erfolgreiche Eindämmung der Ausbreitung sind kontinuierliche Maßnahmen, wie beispielsweise die Reduzierung der Quellen, der Einsatz von Pestiziden oder die Freisetzung steriler männlicher Mücken, notwendig.^[11]

1.1.1.1 Krankheitsbild

Die WHO klassifiziert das Dengue-Fieber in zwei Hauptkategorien; I) Dengue-Fieber (DF) mit oder ohne Warnsignale und II) schweres Dengue-Fieber.^[1] Plötzliches Fieber tritt nach einer Inkubationszeit von vier bis sieben Tagen (zum Teil 3–14), unter anderem begleitet von Kopfschmerzen, generalisierter Myalgie, Gesichtsrötung, Übelkeit und häufig einem generalisierten Hautausschlag, auf. Bei einem schwereren Verlauf, dem sogenannten hämorrhagischen Dengue-Fieber (DHF), hält das hohe

Fieber bis zu sieben Tage (7-Tage-Fieber) an. Zusätzlich ist Letzteres gekennzeichnet durch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, die durch verstärkte Blutungen eine Thrombozytopenie sowie Aszites nach sich ziehen kann. In Folge eines großen Blutverlustes kommt es schließlich zum Dengue-Schock-Syndrom (DSS), gekennzeichnet durch Kreislaufversagen und Schock.^[1,4,12,13]

1.1.1.2 Therapie

Da derzeit keine spezifische antivirale Therapie existiert, besteht nur die Möglichkeit einer symptomatischen, unterstützenden Behandlung. Der Therapieerfolg ist dabei stark abhängig von der körperlichen Verfassung des Patienten sowie dem schnellen Handeln nach Verschlechterung des Zustandes.^[14] Eine ausgeheilte Infektion führt zu einer lebenslangen Immunität gegen den ursächlichen Serotyp (vgl. Abschnitt 1.1.2). Ebenfalls entwickelt sich eine bis zu zwei Jahre anhaltende Kreuzimmunität gegenüber den anderen Serotypen.^[2,15,16] Nach Verlust der Kreuzimmunität ist die Infektion mit einem anderen Serotyp besonders gefährlich. Die bei der Erstinfektion ausgebildeten Antikörper sind häufig nicht ausreichend, den neuen Serotyp vollständig zu neutralisieren. Stattdessen erleichtern diese die Aufnahme in die Zellen bei einer erneute virale Infektion und führen zu schwereren Verläufen. Diese antikörperabhängige Verstärkung (*antibody-dependent enhancement* (ADE)) erschwert zudem die Entwicklung eines Impfstoffes. Derzeit befinden sich fünf verschiedene Impfstoffe in unterschiedlichen klinischen Phasen. Der bereits in einigen endemischen Ländern zugelassene Lebend-Impfstoff Dengvaxia® (CYD-TDV, *Sanofi-Pasteur*) richtet sich gegen alle vier Serotypen, jedoch mit unterschiedlichem Erfolg. Zudem führt eine Impfung seronegativer Personen zu einem schwerwiegenden Verlauf bei einer Zweitinfektion.^[17,18] Eine weitere Herausforderung bei der Entwicklung eines langwirksamen tetravalenten Impfstoffes besteht in einem kostengünstigen und sensitiven Tiermodell.^[17]

1.1.2 Dengue-Virus

Die Gattung „*Flaviviren*“ der Virusfamilie *Flavirividae* umfasst über 70 Virusarten, zu denen neben dem Dengue-Virus (DENV), u. a. das West-Nil-Virus (WNV), das Zika-Virus (ZIKV) und das Gelbfieber-Virus (YFV) gehören. Die vier humanpathogenen Serotypen (DENV1–4) weisen eine 30%ige Divergenz im Genom des Polyproteins auf. Zudem wird innerhalb eines Serotyps zwischen Genotypen und Kladen unterschieden, welche unterschiedliche Virusfitness, epidemisches Potential und Virulenz aufweisen.^[5,19] 2013 fand ein über den sylvatischen Zyklus übertragener fünfter Serotyp Erwähnung.^[20]

1.1.2.1 Das Genom und der Infektionszyklus von Flaviviren

Die umhüllten Flaviviren mit einem Durchmesser von rund 50 nm weisen eine ikosaedrische, sphärische Struktur auf (siehe **Abbildung 1.2, A**).^[21,22] Das flavivirale Genom mit rund 11000 Basen besteht aus einer positiv orientierten Einzelstrang-RNA ((+)ss-RNA) die mit mehreren Kopien des Capsidproteins (C-Protein) komplexiert.^[21,23] Dieses Nucleocapsid wird wiederum von einer Lipiddoppelschicht verpackt. Auf der von der Wirtszelle abgeleiteten Lipiddoppelschicht befinden sich zudem 180 Kopien des Hüll-Glykoproteins (E-Dimer) und des Membranproteins (M-Protein). In unreifen Virionen liegt das Membranprotein als Vorläuferprotein (prM) vor.^[24,25]

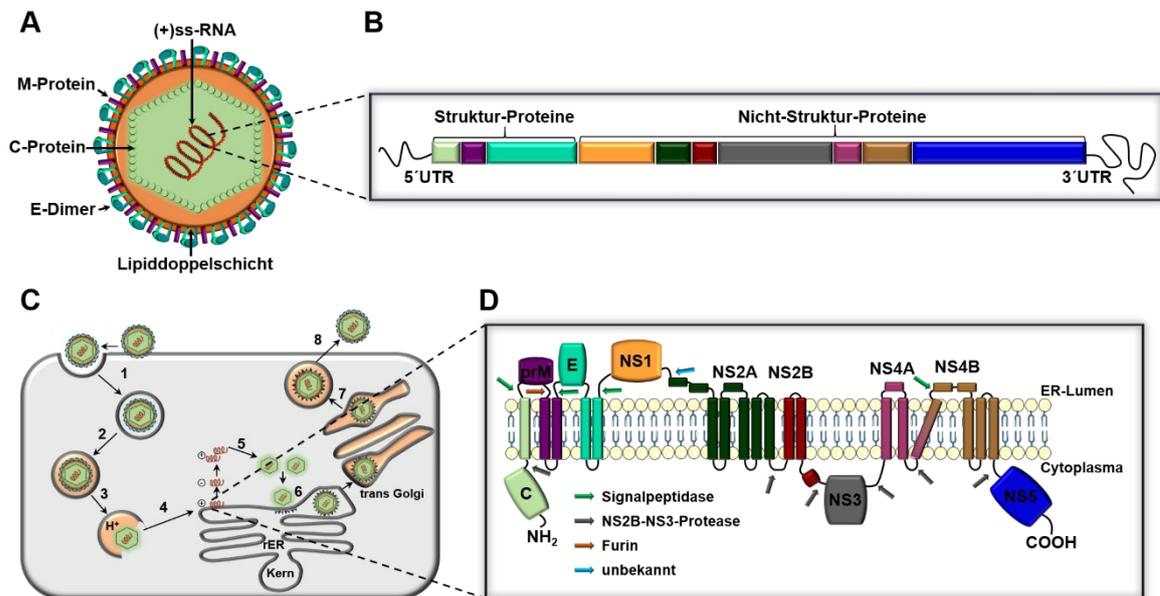


Abbildung 1.2: Struktur und Genom von Flaviviren. **A)** Schematischer Aufbau eines Flavivirus. **B)** Virales Genom mit den codierenden Bereichen für Struktur-Proteine und Nicht-Struktur-Proteine. **C)** Schematische Darstellung des Replikationszyklus in der Wirtszelle (1: Adhäsion des Viruspartikels mit anschließender rezeptorvermittelter Endozytose, 2: Ausbildung eines sauren Endosoms, 3: Freisetzung der viralen RNA nach Membranfusion, 4–6: Translation des Genoms in ein Vorläuferprotein (**B**), Prozessierung, Replikation und Assemblierung am rER, 7: Spaltung (Furin) und Reifung eines Virions zu infektiösen Viruspartikeln im *trans*-Golgi-Netzwerk, 8: Freisetzung des Viruspartikels durch Exozytose), **D)** Schematische Darstellung des Polyproteins in der Membran des rER (Struktur-Proteine: Capsidprotein (C), Vorläufer-Membranprotein (prM), Hüll-Glykoprotein (E) und Nicht-Struktur-Proteine: NS1–NS5). Die Spaltstellen der proteolytischen Enzyme sind mit Pfeilen dargestellt. Die Grafiken wurden mit Microsoft PowerPoint erstellt in Anlehnung an Referenzen.^[5,23,26]

Der Eintritt des Virus in die Wirtszelle erfolgt über eine rezeptorvermittelte Endozytose unter Ausbildung eines Endosoms (vgl. **Abbildung 1.2, C**). Aufgrund des sauren pH-Wertes kommt es zu einer Konformationsänderung des Hüll-Glykoproteins (E-Protein), wodurch eine Membranfusion der Virus- und Wirtszelle ausgelöst wird. Infolgedessen wird das Genom in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Nach Translation der RNA in das Vorläuferprotein erfolgt dessen Spaltung autokatalytisch durch die viruseigene NS2B-NS3-Protease sowie durch Wirts-Proteasen in drei N-terminale Strukturproteine (C-Protein, prM-Protein, E-Protein) und sieben C-terminale Nicht-Struktur-Proteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (siehe **Abbildung 1.2, B & D**). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5 bildet einen komplementären negativen RNA-Strang aus, der wiederum als Vorlage zur Replikation neuer positiv orientierter RNA dient. Eine Assemblierung neuer, zunächst nicht

infektiöser, Viruspartikel findet im Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Im *trans*-Golgi-Netzwerk werden die unreifen Virionen durch Spaltung des prM in M schließlich zu reifen Viruspartikeln, die über Exozytose die Wirtszelle verlassen.^[5,23,25,27]

Die Nicht-Struktur-Proteine spielen im Gegensatz zu den Strukturproteinen eine entscheidende Rolle bei der Virusreplikation und sind direkt an der Morphogenese infektiöser Virionen beteiligt.^[28] **Tabelle 1.1** gibt eine Übersicht über die wesentlichen Funktionen der Nicht-Struktur-Proteine.

Tabelle 1.1: Übersicht der Funktionen von Nicht-Struktur-Proteine in Anlehnung an GUZMAN *et al.*^[5].

Protein	Merkmal	Funktion
NS1	ER-Verankerung, Membran-assoziiert, sekretiert (sNS1)	frühe virale RNA-Replikation, Aktivierung des angeborenen Immunsystems (sNS1)
NS2A	hydrophobes integrales Membranprotein	RNA-Replikation
NS2B	kleines hydrophobes Protein	Co-Faktor von NS3
NS3	multifunktionelles Protein	virale Protease, Helikasefunktion während RNA-Synthese
NS4A	hydrophobes integrales Membranprotein	Ausbildung des Replikationsvesikels
NS4B	kleines hydrophobes Protein	Unterdrückung der Signalübertragung (IFN β , IFN γ)
NS5	großes, hochkonserviertes Protein	RNA-Synthese, Blockade des IFN-Systems

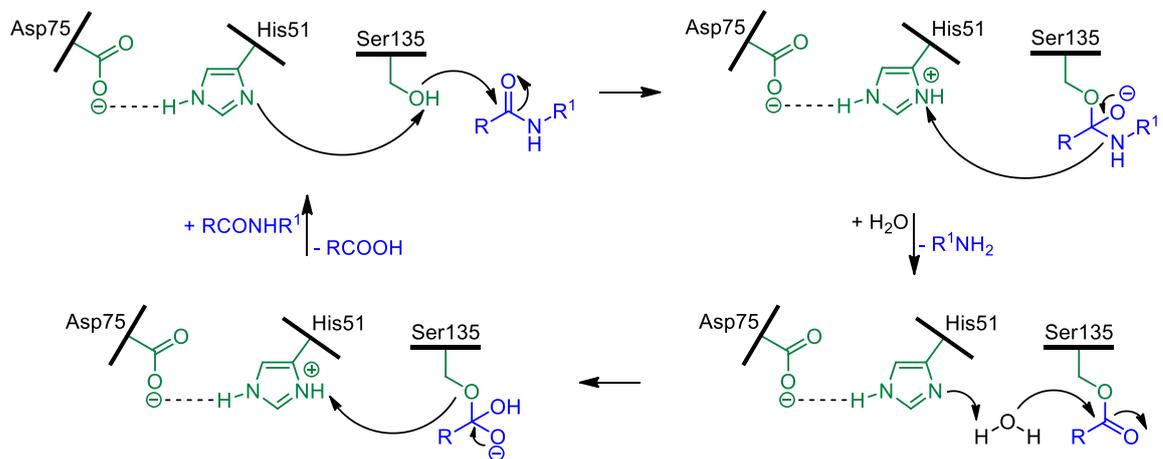
1.1.3 DENV-NS2B-NS3-Protease

Die Trypsin-ähnliche Serinprotease DENV-NS2B-NS3-Protease wird aufgrund der katalytischen Aktivität den Hydrolasen bzw. den Serin-Endopeptidasen zugeordnet (EC 3.4.21).^[29,30] Basierend auf der Aminosäuresequenz werden Proteasen (Peptidasen) zudem, nach D. RAWLINGS und J. BARRETT, entsprechend ihrer Verwandtschaftsbeziehungen klassifiziert.^[31,32] In der frei zugänglichen Datenbank MEROPS (www.ebi.ac.uk/merops) erfolgt die hierarchische Einteilung in Familien (abhängig von der AS-Sequenz) und Clans (unabhängig von der AS-Sequenz). Die DENV-NS2B-NS3-Protease wird demnach der Familie S7 (Flavivirin-Familie, Gelbfiebervirus), dem Clan PA (Endopeptidasen) und dem Subclan PA(S) (Serin-Endopeptidase mit katalytischer Triade (His, Asp, Ser)) zugeordnet.^[31,33]

1.1.3.1 Struktur und katalytische Aktivität

Das multifunktionale Protein NS3, bestehend aus 618 Aminosäuren, spielt nicht nur als Protease, sondern auch als Helikase und RTPase/NTPase im Replikationszyklus des Virus eine entscheidende Rolle.^[34] Die Protease-Domäne mit der katalytischen Triade ist N-terminal (AS 1–180) lokalisiert und besteht aus sechs β -Strängen (vgl. **Abbildung 1.5**). Diese bilden zwei β -Fässer aus, welche sich sandwichartig um das katalytische Zentrum legen. Die katalytische Aktivität ist dabei von einem 40 Aminosäure langen Rest im hydrophoben Bereich des NS2B-Co-Faktors abhängig. Der C-terminale Rest des NS2B-Co-Faktors legt sich gürtelartig um die NS3-Protease und ist sowohl an der Ausbildung der Substratbindetasche (S2 und S3, vgl. **Abbildung 1.3**) beteiligt, als auch an der Verankerung des NS2B-NS3-Komplexes in der Membran des ER.^[34–36]

Die im aktiven Zentrum gelegene katalytische Triade, bestehend aus Histidin 51 (His51), Aspartat 75 (Asp75) und Serin 135 (Ser135), der DENV-NS2B-NS3-Protease akzeptiert als Erkennungssequenz zwei basische Reste.^[37] Der nucleophile Angriff des Ser135 an den Carbonylkohlenstoff der Amidbindung initiiert die Spaltung des Substrats (siehe **Schema 1.1**). Die Nucleophilie des aliphatischen Alkohols von Ser135 wird dabei durch His51 und Asp75 erhöht.



Schema 1.1: Enzymatischer Mechanismus der Substratspaltung durch die katalytischen Triade His51, Asp75 und Ser135 der DENV-NS2B-NS3-Protease. Die Aminosäuren sind in grün dargestellt und das Substrat sowie die Spaltprodukte in blau.

Unter Ausbildung eines Imidazolium-Kations greift His51 das Proton des Ser135 an und wird dabei durch die negative Ladung des Asp75 stabilisiert. Nach dem Angriff des Ser135 an den Carbonylkohlenstoff entsteht ein tetraedrisches Intermediat, dessen

negative Ladung zusätzlich durch das Oxyanionen-Loch (*oxyanion hole*) stabilisiert wird. Das freie Amin wird unter Ausbildung des acetylierten Ser135 freigesetzt. Es folgt ein nucleophiler Angriff eines durch His51 aktivierten Wassermoleküls, was schließlich zur Esterhydrolyse unter Freisetzung des Spaltproduktes und Regenerierung des aktiven Zentrums führt (**Schema 1.1**).^[38,39]

Alle vier Serotypen der DENV-NS2B-NS3-Proteasen haben eine stark konservierte Präferenz für Substrate mit dibasischer Sequenz (Arg, Lys) in P1 und P2 Position der Substratbindetasche. Die P3-Position ist hingegen weniger spezifisch, bevorzugt aber auch basische Reste wie Lysin. Dieser Sequenz folgt in P1' eine kleine oder polare Aminosäure (Ser, Gly, Ala) und eine schwach saure Aminosäure (Asp, Glu, Gly) in P2' (**Abbildung 1.3**).^[40]

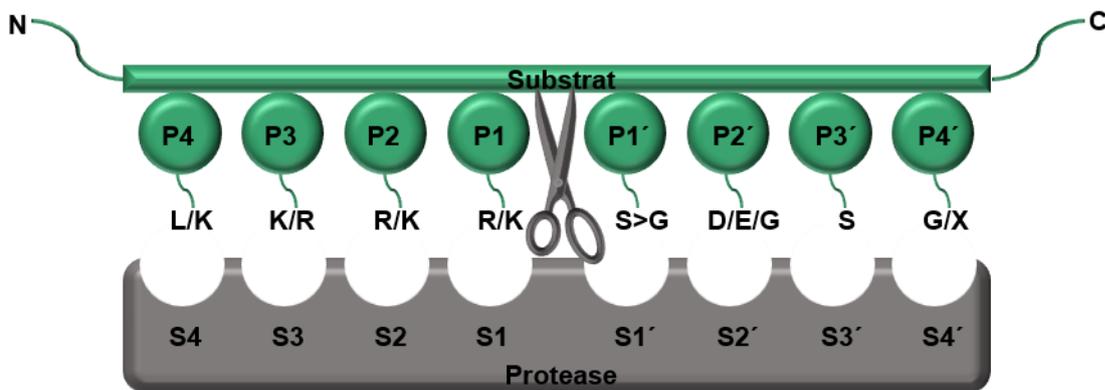


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Substratbindetasche der DENV-Protease. Die Substratspezifität wird durch die Substratbindetaschen S1–S4 bestimmt, die die Aminosäurereste des Substrates P1–P4 erkennen. Die Schnittstelle (Schere) des Substrates durch die Protease befindet sich zwischen P1 und P1'. Die bevorzugten Aminosäuren in P4–P4' basieren auf Studien von Li *et al.*^[40] Die Grafik wurde mit Microsoft PowerPoint erstellt.^[40,41]

1.1.3.2 Allosterische Binderegion

In den letzten Jahren wurde auf der Suche nach DENV-NS2B-NS3-Protease Inhibitoren bei verschiedenen Strukturen ein nicht-kompetitiver Hemmmechanismus identifiziert (siehe Abschnitt 1.1.3.4).^[42,43] Dies veranlasste OTHMAN *et al.* zur Durchführung einer Dockingstudie an der DENV2-NS2B-NS3-Protease, um die Interaktionen dieser Verbindungen (z. B. Pinostrobin vgl. **Abbildung 1.8**) näher zu beschreiben. Es wurde gezeigt, dass die untersuchten Strukturen nicht in das aktive Zentrum binden, sondern an eine allosterische Bindestelle.^[43] NOBLE *et al.* analysierten die Proteinoberfläche der

Kristallstruktur 3U1I (DENV3-NS2B-NS3-Protease) und definierte auf der gegenüberliegenden Seite des aktiven Zentrums eine allosterische Tasche. An der Ausbildung ist sowohl der NS2B-Co-Faktor als auch die NS3-Protease beteiligt (Abbildung 1.4, A).^[36]

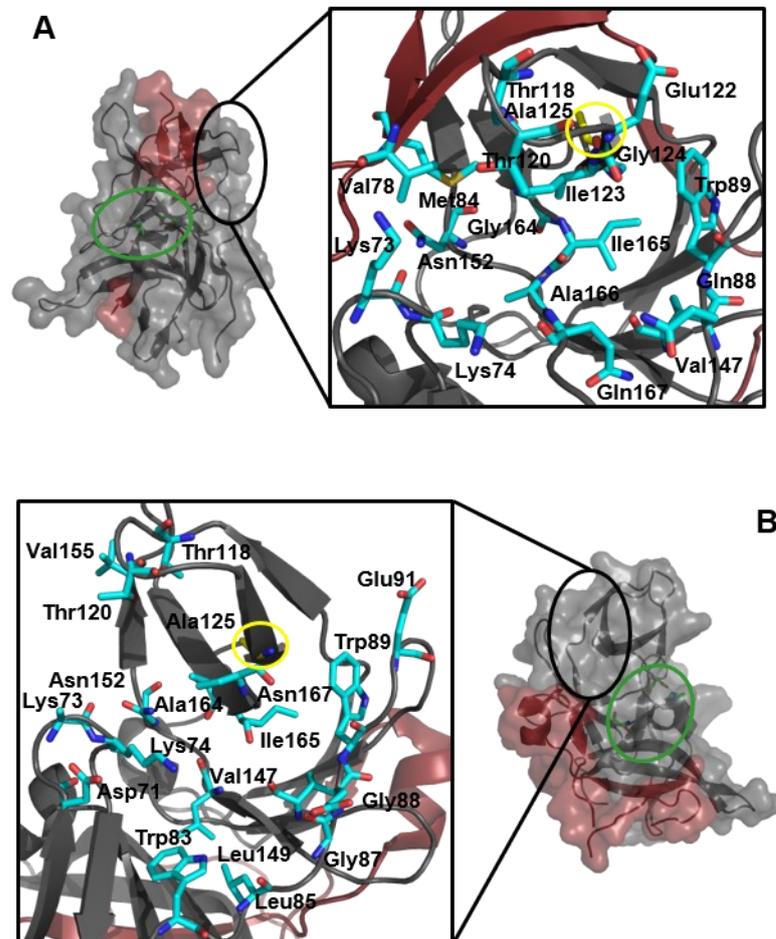


Abbildung 1.4: Allosterische Binderegionen der DENV-NS2B-NS3-Protease. A) Links PDB:3U1I^[36], rechts Zoom in die potenzielle allosterische Binderegion nach NOBLE *et al.*^[36] B) Rechts PDB:2FOM^[44], links Zoom in die allosterische Binderegion nach YILDIZ *et al.*^[37] NS2B-Co-Faktor (grau), NS3-Protease (rot), AS der Binderegion (blaue Sticks), Ala125 (gelber Stick/gelbes Oval), allosterische Binderegion (schwarzes Oval), aktives Zentrum (grünes Oval). Die Grafik wurde mit PyMOL und Microsoft PowerPoint erstellt.

Bei einer visuellen Analyse der DENV2-NS2B-NS3-Protease Struktur 2FOM wurden verschiedene potenzielle allosterische Bindetaschen identifiziert.^[37] YILDIZ *et al.* nutzten den entscheidenden Vorteil der Protease, dass diese keine natürlichen Cysteine in der Sequenz besitzt, um mittels Mutagenese-Studien die gefundenen Taschen zu verifizieren. Eine Region im Bereich der Aminosäure Ala125 (Mutante: Ala125Cys, NS3) wurde dabei als potenzielle Tasche experimentell bestätigt und

befindet sich in der gleichen Region wie von NOBLE *et al.* beschrieben (**Abbildung 1.4, B**). Belegt wurde dies durch Arbeiten von MILLIES *et al.* (Mutagenese- sowie Docking-Studien).^[45]

1.1.3.3 Konformationen

Kenntnisse über die strukturellen Gegebenheiten der DENV-NS2B-NS3-Protease sind von entscheidendem Vorteil in der Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei der Wirkstoffentwicklung. So wurde durch Kristallstrukturanalyse sowie Kernresonanzspektroskopie (NMR-Analytik) das Vorhandensein von vorwiegend zwei Konformationen nachgewiesen.^[35,46] In beiden liegt die NS3-Protease nahezu unverändert vor, der NS2B-Co-Faktor nimmt hingegen verschiedene Konformationen ein. In Abhängigkeit von der Lage des NS2B-Co-Faktors werden die Zustände in der Literatur als „offen“ oder „geschlossen“ bezeichnet (**Abbildung 1.5**).

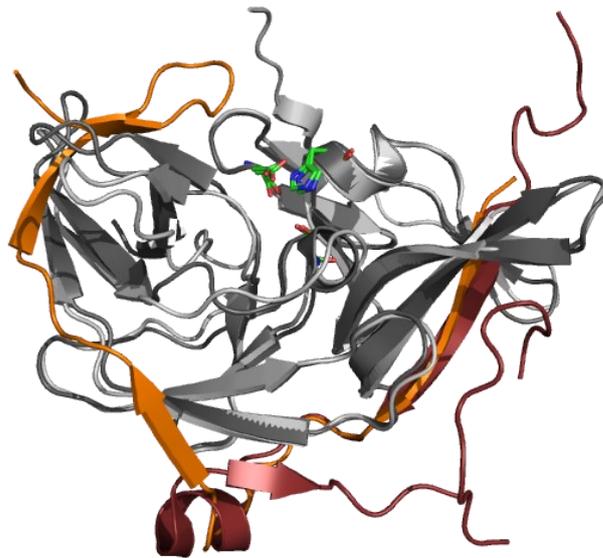


Abbildung 1.5: Überlagerung der offenen (PDB: 2FOM^[44]) und geschlossenen (PDB: 3U1I^[36]) Konformation der DENV-NS2B-NS3-Protease. Farbkodierung: 2FOM; NS2B (rot), NS3 (dunkelgrau), 3U1I; NS2B (orange), NS3 (hellgrau). Das aktive Zentrum ist jeweils in grünen Sticks gezeigt. Die Grafik wurde mit PyMOL erstellt.

Im geschlossenen (PDB: 3U1I^[36]) Zustand legt sich der C-Terminus des NS2B-Co-Faktor unter Ausbildung einer „ β -Haarnadel“ gürtelartig um die NS3-Protease. Da sich diese Konformation im Allgemeinen in Gegenwart eines Substrates oder kompetitiven Inhibitors ausbildet, wird diese auch als „aktive“ Konformation bezeichnet. NMR-Studien legen nahe, dass in Lösung unabhängig von

einem Inhibitor oder dem gewählten DENV-NS2B-NS3-Protease-Konstrukt („gelinkt“ oder „ungelinkt“^a) diese überwiegend in der geschlossenen Form vorliegt (PDB: 2M9P^[47]), aber grundsätzlich beide Konformationen existieren.^[46,48,49] In der „offenen“, als inaktiv bezeichneten, Konformation (PDB: 2FOM^[44]) ist die Elektronendichte des C-Terminus des NS2B-Co-Faktors nicht definiert, sodass nur der N-Terminus aufgelöst ist und von der NS3-Protease dissoziiert vorliegt. Dies weist auf eine sehr hohe Flexibilität des NS2B-Co-Faktors hin.^[35,44,46] Basierend auf diesen Kenntnissen dient im Allgemeinen die geschlossene Konformation als Grundlage für die rationale Wirkstoffentwicklung.^[46] Den Einfluss nicht-kompetitiver Inhibitoren auf die Konformation der DENV-NS2B-NS3-Protease untersuchten BRECHER *et al.*^[50] Es wurde ein Assay entwickelt mit dem die Konformationsänderungen des NS2B-Co-Faktors nachvollzogen werden konnten. Die dafür eingesetzte, geteilte Luciferase wird dabei in der geschlossenen Konformation zusammengeführt und erzeugt ein Lumineszenzsignal. Im Gegensatz dazu wird bei nicht-kompetitiven Inhibitoren kein Lumineszenzsignal detektiert. Dies deutet darauf hin, dass nicht-kompetitive Inhibitoren entweder einen Konformationswechsel von der geschlossenen in die offene Konformation induzieren oder direkt in die offene Konformation binden.^[50] Einen weiteren Hinweis auf die Stabilisierung der offenen Konformation durch einen nicht-kompetitiven Inhibitor lieferten zudem YAO *et al.*^[51] Die Kristallstrukturen (PDB: 6MO0, 6MO1, 6MO2^[51]) deuten auf eine Bindung in die postulierte allosterische Tasche hin (vgl. Abschnitt 1.1.3.2). Da die Elektronendichte nicht eindeutig dem verwendeten Inhibitor zugewiesen werden kann, werden die Strukturen aktuell sehr kontrovers diskutiert. Es wird spekuliert, ob es sich gegebenenfalls dabei um einen Teil des C-Terminus des Proteins und nicht um den Inhibitor selbst handelt.^[52,53]

1.1.3.4 Inhibitoren

Die Entwicklung flaviviraler Proteasehemmstoffe mit Wirkung auf das aktive Zentrum blieben bisher erfolglos. Ursächlich erscheint zum einem das verhältnismäßig flache und unspezifische aktive Zentrum und zum anderem die Wechselwirkung mit

^a Bei einem „gelinkten“ Konstrukt wird zwischen den NS2B-Co-Faktor und der NS3-Protease ein kovalenter Gly₄-Ser-Gly₄-Linker eingeführt. Das „ungelinkte“ Konstrukt entspricht hingegen dem natürlichen Protein mit nicht-kovalenter Assoziation beider Proteine.

bevorzugt basischen Substraten, welche *in vivo* jedoch schlecht verfügbar sind.^[50] Eine alternative Strategie ist die Entwicklung allosterischer bzw. nicht-kompetitiver Inhibitoren um dieses Problem zu umgehen.^[50] Da flavivirale Proteasen grundsätzlich eine hohe Ähnlichkeit in der katalytischen Funktion, Substratspezifität und Form aufweisen, könnte ein erfolgreicher Proteasehemmstoff möglicherweise gegen mehrere Infektionskrankheiten (DENV, WNV, ZIKV) eingesetzt werden.^[54]

Kompetitive Inhibitoren basieren häufig auf peptidischen oder peptidomimetischen Strukturen, die eine Substraterkennungssequenz besitzen und somit die Substratbindung verhindern. Die Entwicklung konzentriert sich dabei auf verschiedene Ansätze wie die Modulation der basischen Reste P1 und P2 durch nicht-natürliche Bausteine (**1**), die Optimierung der N-terminalen Abschlusseinheit (*Cap*, **2**) oder der Einbau einer elektrophilen Kopfgruppe (*warhead*) am C-Terminus (**3**).^[55]

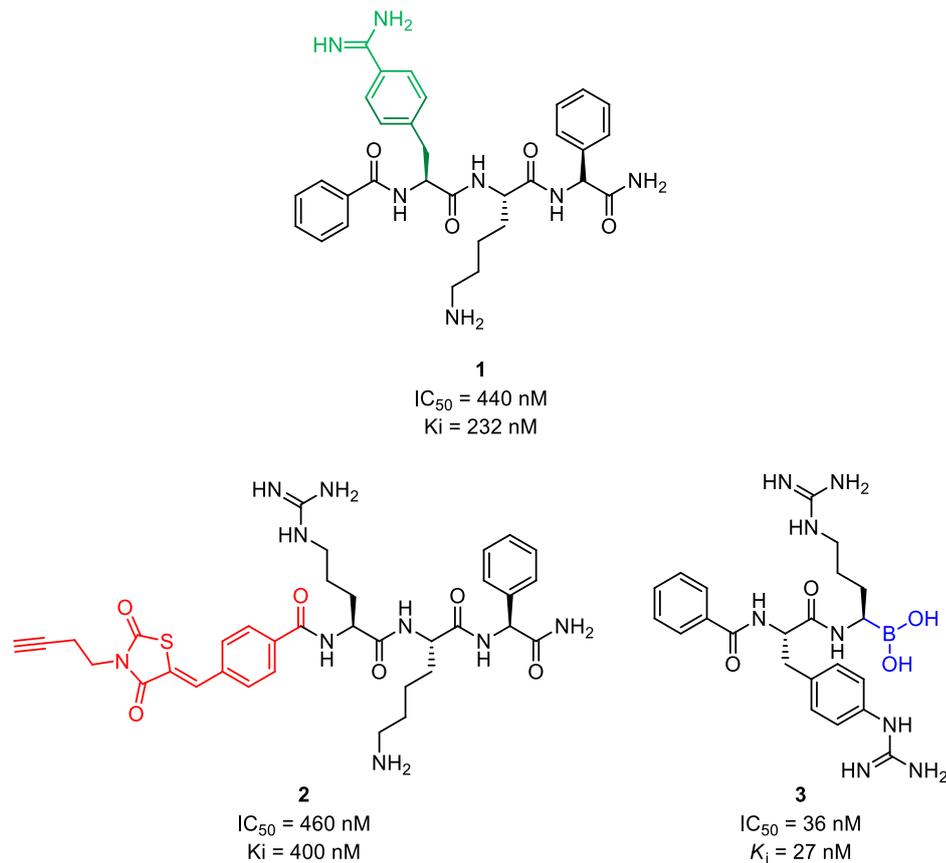


Abbildung 1.6: Kompetitive DENV2-NS2B-NS3-Protease Inhibitoren. **1:** Variation einer basischen Aminosäure durch einen nicht-natürlichen Baustein (grün).^[56] **2:** N-terminales *Cap* (rot).^[57] **3:** C-terminale elektrophile Kopfgruppe (blau).^[58]

Der wesentliche Vorteil der Boronsäure **3** ist die kovalente Bindung an Ser135 im aktiven Zentrum, wodurch eine starke Hemmung erzeugt wird. Ebenfalls unterstützen Boronsäuren, wie auch Aldehyde, die Aufklärung der molekularen Erkennung und strukturellen Übergänge der flaviviralen Proteasen.^[55] Die schlechte Bioverfügbarkeit und Selektivität mit der daraus folgenden Toxizität minimieren jedoch einen möglichen Einsatz als Chemotherapeutika.^[59] Die Verbindungen **1** und **2** besitzen hingegen weiteres Optimierungspotenzial, sodass zukünftig an einer Prodrug-Strategie zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften und antiviralen Aktivität gearbeitet werden sollte.^[56] Ein alternativer Ansatz ist die Synthese und Testung von nicht-peptidischen Inhibitoren (sog. „*small molecules*“). Die in einem Hochdurchsatzscreening (HTS, *high throughput screening*) gefundene Verbindung **4** erreichte einen IC_{50} -Wert von $1.1 \mu\text{M}$ nach Optimierung und Derivatisierung des Grundgerüsts.^[54,60] Allerdings ist auch hier aufgrund der

positiven Ladung die Zellpermeabilität eingeschränkt und keine Aktivität in zellbasierten Assays erkennbar.^[61]

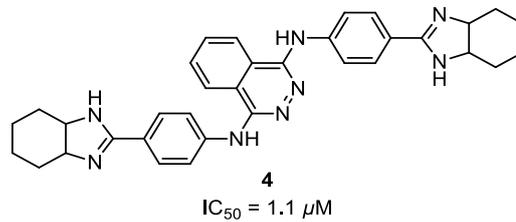


Abbildung 1.7: Kompetitiver DENV2-NS2B-NS3-Protease: Inhibitor mit nicht-peptidischer Struktur.^[60]

Nicht-kompetitive (allosterische) Inhibitoren haben großes Potential zur spezifischen Inhibition. Allosterische Taschen sind weniger konserviert und können gezielt von arzneimittelähnlichen Verbindungen (*drug-like compounds, small molecules*) adressiert werden.^[62] Erste nicht-kompetitive Inhibitoren wurden aus natürlichen Quellen gewonnen. So zeigten die aus *Boesenbergia rotunda* gewonnenen Substanzen Pinostrobin (Flavon) und Cardamonin (Chalkon) eine nicht-kompetitive Hemmung der DENV2-NS2B-NS3-Protease (**Abbildung 1.8**).^[42]

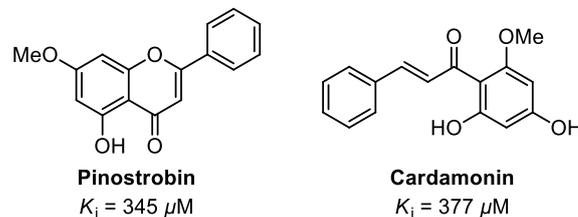


Abbildung 1.8: Nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV2-NS2B-NS3-Protease Pinostrobin und Cardamonin.^[42]

Weitere *small molecules* wurden unter anderem durch HTS/HTVS (*high throughput virtual screening*), niedermolekulare Hybridansätze und kombinatorische Synthese identifiziert.^[63] Durch Screening von *in house* Datenbanken fanden sowohl RAUT *et al.*^[64] (~1000 Verbindungen, **5**) als auch BEESETTI *et al.*^[65] (~2000 Verbindungen, **6**) potente nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV2-NS2B-NS3-Protease im niedrigen mikromolaren Bereich (**Abbildung 1.9**).

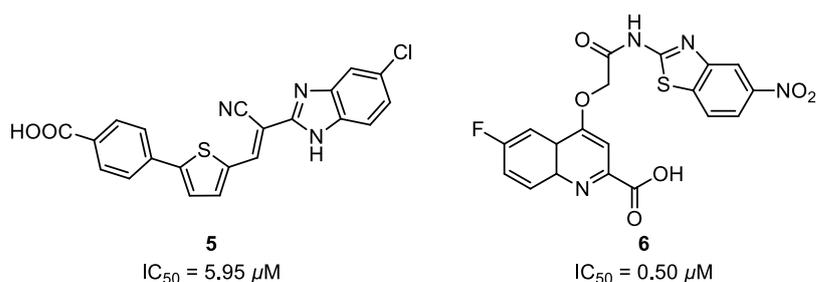


Abbildung 1.9: Nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV2-NS2B-NS3-Protease.^[64,65]

Zudem zeigten beide Verbindungen in zellbasierten Assays (Vero-Zellen) Aktivität gegen die Serotypen 1, 3 und 4 sowie geringe Zytotoxizität (**5** $CC_{50} > 100 \mu M^b$ (**6** $CC_{50} = 75 \mu M$).

Wu *et al.*^[66] isolierten ebenfalls nach einem *in house* Screening von 250 Molekülen mit anschließender kombinatorischer Synthese und Optimierung der Strukturen vielversprechende Inhibitoren (**Abbildung 1.10, 7, 8**). Ausgehend von **8** konnte weiterhin eine neue Leitstruktur mit verbesserter lipophiler Ligandeneffizienz (LLE) durch den Austausch der aromatischen Ethernheit erhalten werden. Das inhibitorische Potenzial gegenüber der DENV2-NS2B-NS3-Protease konnte im Gegensatz zur verwandten ZIKA-Protease jedoch nicht verbessert werden (**Abbildung 1.10**).^[45]

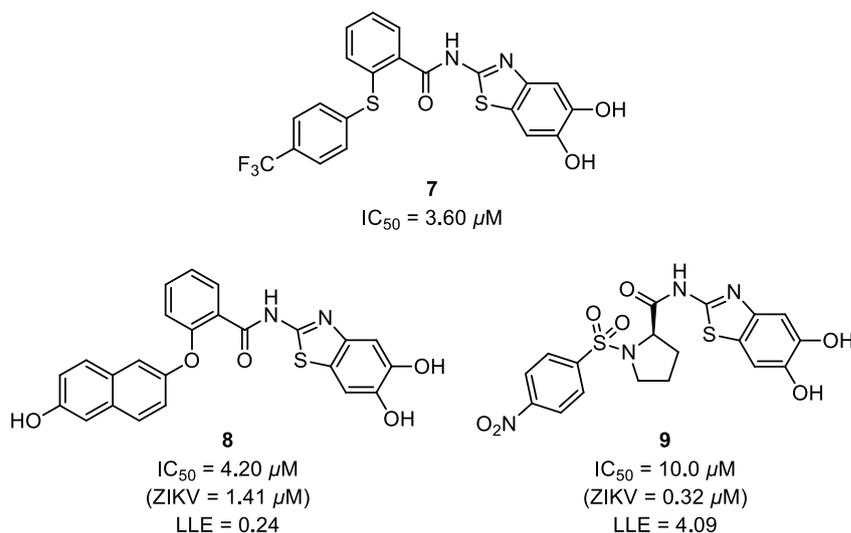


Abbildung 1.10: Nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV2-NS2B-NS3-Protease nach Screening einer *in house* Datenbank und Optimierung der Strukturen.^[66] Verbindung **9** wurde ausgehend von der Leitstruktur **8** entwickelt.^[45]

^b In der Literatur gibt es keine Angabe des CC_{50} -Wertes. Es wird von RAUT *et al.* geschlussfolgert, dass bis zu einer Konzentration von $100 \mu M$ **5** keine nennenswerte Zytotoxizität auftritt.^[64]

1.2 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

1.2.1 Grundlagen und Konzepte

1.2.1.1 Fluoreszenz und Fluorophore

Das Phänomen der Fluoreszenz etablierte sich als sensitive Technik an der Schnittstelle von Biologie, Chemie und Physik. Neben der Ausreifung und Neuentwicklung von Techniken (z.B. Mikroplatten-Photomultiplier, Einzelphotonen-Lawinendioden, Mikroskope) in den letzten Jahrzehnten, ist vor allem die Zeitskala molekularer Wechselwirkungen entscheidend für die Anwendung von Fluoreszenzen. Ausgehend von einer typischen Fluoreszenzlebensdauer von ~ 10 ns können mit der Fluoreszenzspektroskopie beispielsweise dynamische Proteinereignisse, wie Konformationsänderungen in biologischen Systemen detektiert werden.^[67] Fluoreszenz wird im Allgemeinen von Strukturen mit delokalisierten π -Elektronensystem erzeugt. Moleküle, die zur Fluoreszenz fähig sind (z. B. Chinin), werden als Fluorophore bezeichnet (**Abbildung 1.11, A**).

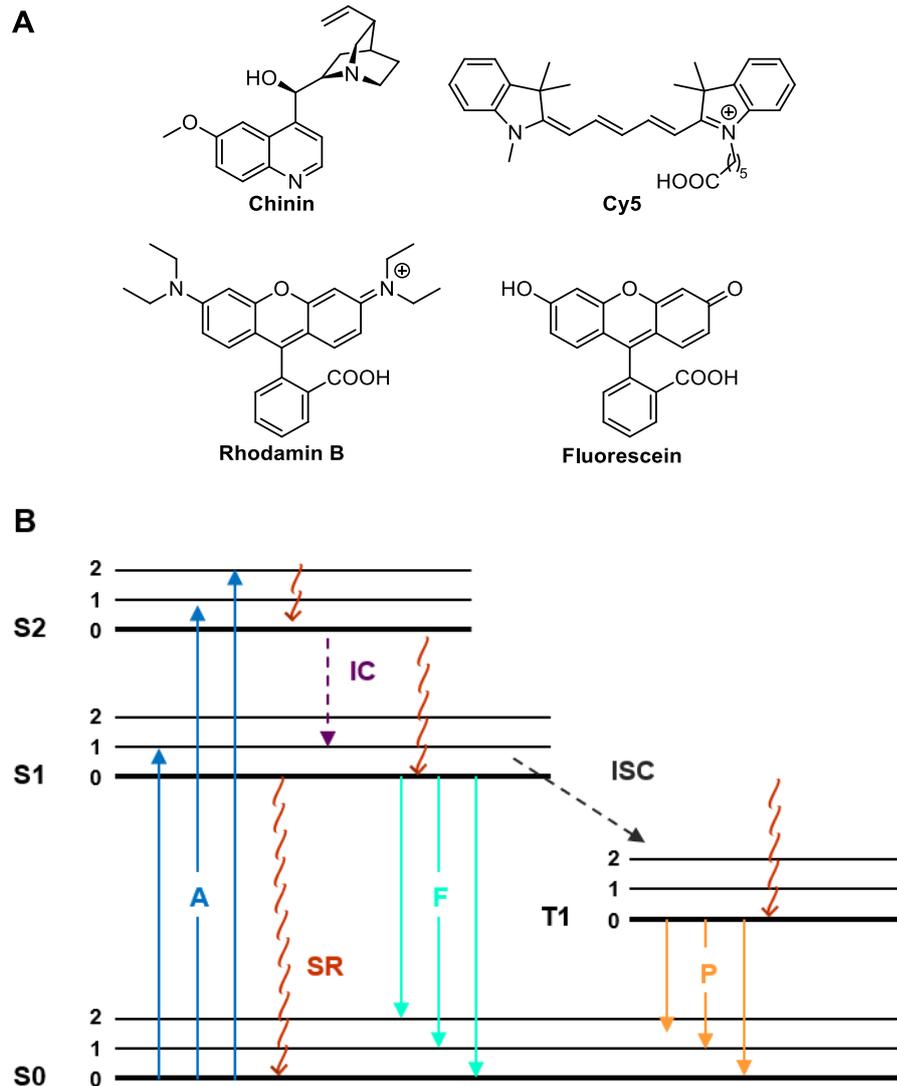


Abbildung 1.11: A) Klassische Fluorophore. B) Jablonski-Diagramm: Singulett-Zustände (S0, S1, S2), Triplett-Zustand (T1), Absorption (A, $t \approx 10^{-15}$ s), Fluoreszenz (F, $t \approx 10^{-6}$ – 10^{-8} s), Phosphoreszenz (P, $t \approx 10^{-2}$ – 10^{-4} s), innere Konversion (*internal conversion*, IC), Interkombination (*intersystem crossing*, ISC), Schwingungsrelaxation (SR). Grafik B erstellt mit Microsoft PowerPoint in Anlehnung an Referenzen^[68,69].

Die Prinzipien der Fluoreszenz können mit dem Jablonski-Schema näher beschrieben werden (**Abbildung 1.11, B**). Die Anregung eines Elektrons aus dem Grundzustand S0(0) in verschiedene Schwingungszustände der elektronisch angeregten Zustände (S1(0,1,2), S2(0,1,2)) erfolgt durch Absorption (A) eines Photons ohne Änderung des Elektronenspins. Nach schneller innerer Konversion (IC) von Elektronen in höheren Schwingungsebenen auf die niedrigste angeregte Schwingungsebene S1(0) fällt das Elektron entweder unter Aussendung von Photonen (Fluoreszenz, F) oder durch Schwingungsrelaxation (SR, strahlungslos) zurück in den elektronischen

Grundzustand S0 (Kasha-Regel). Der Schwingungsgrundzustand von S1 kann zudem durch Interkombination (ICS) unter Spin-Umkehr entvölkert werden. Dadurch gelangt das Elektron in den langlebigen Triplett-Zustand T1. Die Emission eines Photons beim Übergang von T1 in S0 wird als Phosphoreszenz bezeichnet, welche im Allgemeinen energieärmer und langlebiger ist im Vergleich zur Fluoreszenz. Beide Phänomene werden der Lumineszenz zugeordnet.^[67-69]

Relevante Eigenschaften von Fluorophoren (vgl. **Abbildung 1.11, A**) für spektroskopische Untersuchungen sind vor allem die Fluoreszenzlebenszeit (τ) sowie die Quantenausbeute (Q). Die Fluoreszenzlebenszeit (τ) gibt die mittlere Zeit an, in der sich ein Fluorophor im angeregten Zustand befindetet. In dieser Zeit können Wechselwirkungen mit der Umgebung untersucht werden (**Formel 1.1**, Γ = Emissionsrate des Fluorophors, k_{nr} = Rate der strahlungslosen Übergänge in S0). Durchschnittlich beträgt die Fluoreszenzlebenszeit 10 ns.^[68]

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad \mathbf{1.1}$$

Die Quantenausbeute (Q) gibt darüber Aufschluss, wie viele Photonen im Vergleich zur Anzahl der absorbierten Photonen emittiert werden (**Formel 1.2**).^[68]

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad \mathbf{1.2}$$

1.2.1.2 Fluoreszenzanisotropie

Voraussetzung für die Absorption eines Photons ist neben der erforderlichen Energie, die Ausrichtung des elektrischen Vektors des Anregungslichtes. Dieser muss parallel bzw. annähernd parallel zum Absorptionsübergangsdipolmoment des Moleküls orientiert sein.^[67] Wird eine Farbstofflösung mit linear polarisiertem Licht angeregt, werden bevorzugt Fluorophore angeregt, deren Absorptionsübergangsdipolmoment möglichst parallel zur Schwingungsebene des elektrischen Feldes des Anregungslichtes steht. Diese Photos Selektion bedingt ebenfalls eine Polarisierung der ausgesandten Fluoreszenz. Die Polarisierung des Fluoreszenzlichtes kann über die Größe der Fluoreszenzanisotropie quantifiziert werden.^[70] Bei einer schnelleren

Rotationsdiffusion des angeregten Moleküls klingt die Fluoreszenzpolarisation schneller ab und kann auch durch Übertragung der Anregungsenergie verringert werden. Die Rotationsdiffusion ist wiederum abhängig von der Viskosität der Umgebung, aber auch von der Form und Größe des Moleküls. Messungen der Fluoreszenzpolarisation können somit genutzt werden, um Informationen über die Form, Größe und Flexibilität von Molekülen zu erhalten.^[67,68,71]

1.2.1.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenz

Die Messung der Fluoreszenz kann grundsätzlich über eine stationäre (*steady-state*) oder zeitaufgelöste (*time-resolved*) Messmethode erfolgen.^[68] Bei der stationären Messung wird die Probe mit einem kontinuierlichen Lichtstrahl bestrahlt. Über den Intensitätsabfall der Probe werden gemittelte Informationen der zeitaufgelösten Phänomene erhalten. Durch die zeitaufgelöste Messung von Intensitätszerfällen oder Anisotropiezerfällen mittels eines Lichtimpulses, dessen Breite typischerweise kürzer als die Fluoreszenzlebenszeit des betrachteten Farbstoffes ist, können Intensität oder Anisotropie auf einer „ns“-Zeitskala detektiert werden. Somit werden beispielsweise Informationen über dynamische und statische Fluoreszenzlöschungen durch Messungen der Lebenszeit erhalten oder es können Energietransfers genauer untersucht werden.^[68,70] Eine häufig angewandte Technik um zeitaufgelöste Fluoreszenz zu detektieren, ist die zeitkorrelierte Einzelphotonen-Zähltechnik (*time correlated single photon counting technique*, TCSPC).^[67,68] Bei dieser Technik wird weniger als ein Photon pro Laserimpuls detektiert (1 Photon/100 Anregungsimpulse). Gemessen wird die Zeit zwischen dem Anregungsimpuls und der Detektion des emittierten Photons, wodurch in einem Histogramm die Wellenfunktion des Zerfalls dargestellt werden kann.^[68]

1.2.2 Methoden und Anwendung

1.2.2.1 Einzelmolekülspektroskopie

Mit der Einzelmolekülfluoreszenz-Spektroskopie (*single molecule fluorescence spectroscopy*, SMFS) können Eigenschaften individueller Spezies bestimmt werden, ohne dass eine Mittelung der Eigenschaften erfolgt.^[72,73] So können von Molekül zu Molekül verschiedene Eigenschaften (statische Unordnung) oder sich zeitlich

ändernde Eigenschaften (dynamische Unordnung) interpretiert werden.^[73] Die Fluoreszenzeigenschaften (Fluoreszenzemissionsintensität, Lebensdauer, Polarisation und Quantenausbeute) liefern Informationen über die Struktur, Dynamik und Interaktion biochemischer Systeme. Dadurch können Konformationsänderungen und Proteinfaltungen, Enzymkinetiken sowie intra- und intermolekulare Abstände untersucht werden.^[73,74] Voraussetzungen für die SMSF sind zum einen, dass sich nur ein Molekül im Untersuchungsvolumen ($\sim 10^{-10}$ mol/L in $10 \mu\text{m}^3$ (RT)) befindet und zum anderen ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis (Signal des Fluorophors möglichst groß im Vergleich zum Hintergrund).^[72] Ein Großteil der Experimente wird an immobilisierten Molekülen durchgeführt, typischerweise unter Verwendung eines Lasers zur Anregung durch ein Mikroskop-Objektiv (MO) und eines beweglichen Probenstisches. Durch eine konfokale Optik können zudem unerwünschte Signale (z. B. Ramanstreuung) abgeleitet werden (siehe Abschnitt 1.2.2.2).^[68]

1.2.2.2 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie ist eine häufig genutzte Methode zur Detektion von einzelnen Fluorophoren beziehungsweise Molekülen. Grundvoraussetzungen sind dabei gute photophysikalische Eigenschaften (z. B. hohe Fluoreszenzquantenausbeute oder Photostabilität) und die Unterdrückung von Rayleigh- und Ramanstreuungen (elastische und inelastische Streuvorgänge).^[70,73] Durch Verwendung geeigneter optischer Filter kann dieses Streulicht von der zu untersuchenden Fluoreszenz spektral abgetrennt werden.^[70] Der schematische Aufbau eines konfokalen Mikroskops ist in **Abbildung 1.12** gezeigt.

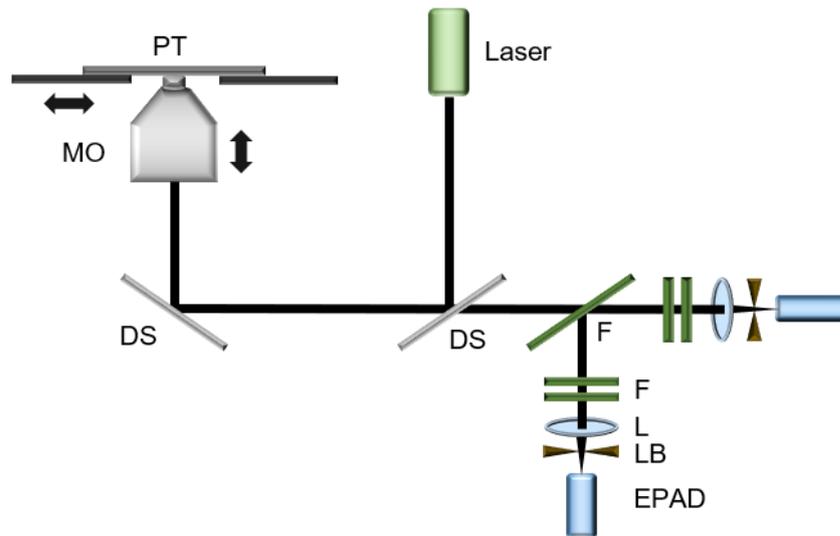


Abbildung 1.12: Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Grafik erstellt mit Microsoft PowerPoint in Anlehnung an Referenzen.^[70,75,76] Aufbau: Mikroskop-Objektiv (MO), Probentisch (PT, Piezotisch mit Bewegung entlang der x, y, und z-Achse), Dichroitischer Spiegel (DS), Filter (F), Linse (L), Lochblende (LB), Einzelphoton-Avalanche-Diode (EPAD).

Der Laserstrahl wird vom Mikroskop-Objektiv (MO) mit hoher numerischer Apertur in die Probe fokussiert, wobei der Fokus durch die Beugung limitiert ist. Die Fluoreszenz wird durch dasselbe Objektiv eingesammelt und zusätzlich durch einen dichroitischen Spiegel (DS) vom Anregungslicht getrennt. Durch weitere Spektralfilter (z. B. Langpassfilter) wird unter anderem gestreutes Anregungslicht unterdrückt, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert wird (Unterdrückung des Hintergrundes). Das gesammelte Fluoreszenzlicht wird anschließend auf eine konfokale Apertur fokussiert. Die eintreffenden Photonen werden mit einem entsprechenden Detektor (Lawinenphotodioden, EPAD) detektiert.^[70,73] Gemessen wird durch diesen Aufbau nur ein definiertes Volumen in der Probe (0.5–1.0 fL).^[73] Mit einem konfokalen Laserrastermikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) können Daten über immobilisierte Moleküle erhalten werden. Bei dieser Methode scannt der fokussierte Laser die Oberfläche, um Fluoreszenzsignale entlang einer Linie aufzunehmen. Ebenfalls können Fluoreszenzbilder in zwei Richtungen aufgenommen werden oder um eine dritte räumlichen Dimension erweitert werden.^[70] Vorteile dieser Technik sind: ein hohes Signal-Hintergrund-Verhältnis, eine homogene Probenausleuchtung bei gleichmäßigem Scan und Untersuchung der Prozesse im Pikosekunden-Bereich, durch Einzelpunkt-Detektoren. Eine weitere Anwendung ist die Messung von spektralen Eigenschaften (Polarisation oder Emissionswellenlänge) durch die

Aufspaltung des detektierten Lichtes in mehrere Kanäle. Nachteilig ist hingegen die begrenzte Scangeschwindigkeit zur Aufnahme eines Bildes.^[70]

1.2.2.3 Förster-Resonanz-Energie-Transfer

THEODOR FÖRSTER beschrieb bereits 1946 den Prozess der Energiewanderung beziehungsweise Energieübertragung (Energietransfer, ET) und hat auf dessen Bedeutung in Photosynthesystemen hingewiesen.^[68,77,78] Dabei handelt es sich um einen strahlungslosen Energieübertrag von einem angeregten Donormolekül auf ein benachbartes Akzeptormolekül, welches anschließend die Energie in Form von Fluoreszenz wieder abgibt.^[77] Anwendung findet der sogenannte Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) in der medizinischen Diagnostik, DNA-Analyse und optischen Bildgebung.^[68] Der Energieübertrag ist dann möglich, wenn sich das Emissionsspektrum des angeregten Donormoleküls mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptormoleküls (im Grundzustand) überlagert. Basierend auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (oszillierender Dipol) findet der Energieübertrag statt (vgl. **Abbildung 1.13, A**).

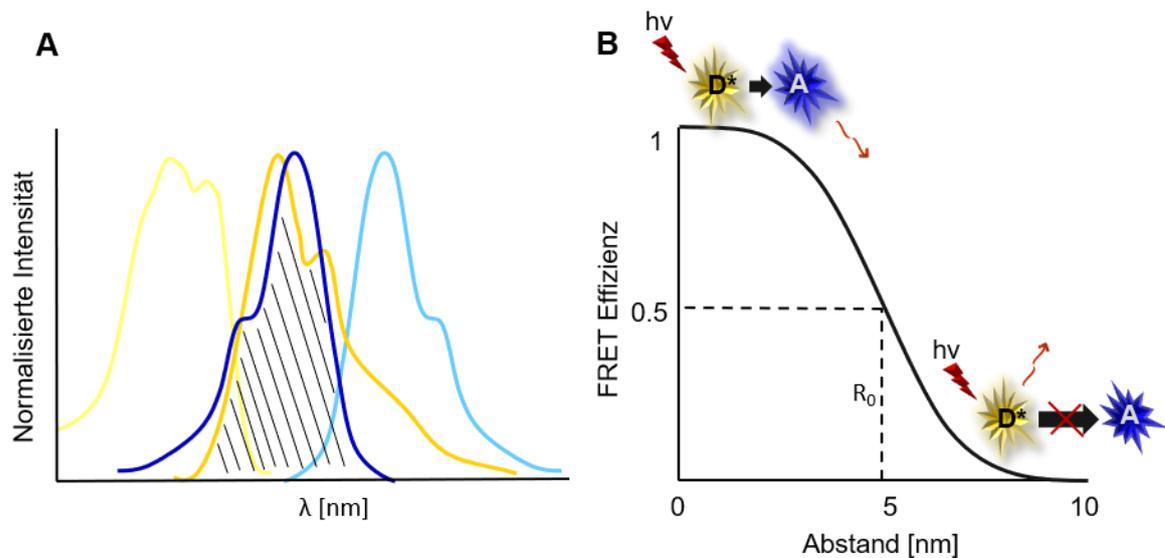


Abbildung 1.13: **A)** Schematische Darstellung der Überlappung (schwarze Linien) des Emissionsspektrums des Donormoleküls (gelb, Absorptionsspektrum: hellgelb) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptormoleküls (blau, Emissionsspektrum: hellblau). **B)** Förster-Resonanz-Energie-Transfer in Abhängigkeit vom Abstand. Nach Anregung des Donormoleküls (gelb) mit Licht entsprechender Wellenlänge ($h\nu$) erfolgt durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Energieübertrag auf das Akzeptormolekül (blau) mit anschließender Emission der Fluoreszenz (oranger Pfeil). Bei zu großem Abstand (rechts unten) zwischen Donor und Akzeptor findet der Energieübertrag nicht statt und das Donormolekül emittiert die Fluoreszenz. Die Grafik wurde mit Microsoft PowerPoint erstellt in Anlehnung an Referenzen.^[76,79]

Die Geschwindigkeit des Energietransfers ist dabei abhängig von der spektralen Überlappung des Emissionsspektrums (Donormolekül) und Absorptionsspektrums (Akzeptormolekül), der relativen Ausrichtung der Donor- und Akzeptormolekül Übergangsdipolmomente, dem Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül und der Fluoreszenzquantenausbeute des Donormoleküls in Abwesenheit des Akzeptors.^[68,70] Die Effizienz des Energieübertragung wird unter anderem durch den Abstand zwischen dem Donor- und Akzeptormolekül bestimmt, sodass FRET als sogenanntes „spektroskopisches Lineal“ für Abstandsmessungen eingesetzt werden kann (siehe **Abbildung 1.13, B**).^[68] Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die Transfereffizienz 50% beträgt, wird durch den Försterradius R_0 (2–9 nm) beschrieben, welcher wie folgt abgeschätzt werden kann (**Formel 1.3**, n = Brechungsindex des Mediums, Φ_0 = Fluoreszenzquantenausbeute des Donormoleküls in Abwesenheit des Akzeptors, J = spektrales Überlappungsintegral, κ = Orientierungsfaktor).^[70]

$$R_0[\text{nm}] = 979(\kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot \Phi_0 \cdot J)^{1/6} \quad 1.3$$

Die Energieübertragungsrates ($k_T(r)$) zwischen einem Donormolekül und einem Akzeptormolekül ist gegeben durch;

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad 1.4$$

mit τ_D = Abklingzeit des Donormoleküls in Abwesenheit des Akzeptormoleküls und r = Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül.^[68]

GOURIDIS *et al.* gelang es durch Einzelmolekül-FRET (*single molecule FRET*, smFRET) mit einem konfokalen Laserrastermikroskop dynamische Konformationsänderungen des ABC-Transporters (*ATP binding cassette*, ABC) GlnPQ zu identifizieren.^[80] ABC-Transporter spielen als integrale Membranproteine unter anderem eine wichtige Rolle bei der Ausscheidung von Arzneimitteln und Antibiotika, dem Lipidtransport oder der Nährstoffaufnahme.^[80,81] Die Homodimere bestehen aus zwei Transmembrandomänen (TMD), zwei zytoplasmatischen Nucleotidbindedomänen (NBD) und einer Substratbindedomäne (SBD) oder einem separaten substratbindendem Protein (SBP).^[80,82] Untersucht wurde die Dynamik der SBD des Importeurs GlnPQ (Import von Asparagin, Glutamin und Glutamat,) nach Immobilisierung und in freier Diffusion. In Abwesenheit des Substrats lagen 95% der Moleküle in einer offenen Konformation vor. Die Substratzugabe löst eine Konformationsänderung aus, sodass eine geschlossene Konformation vorliegt, welche mit der Zeit wieder in den offenen Zustand zurück geht. Der geschlossene Zustand nimmt somit einen entscheidenden Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit.^[80,82]

1.2.2.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) werden Informationen über die Detektion von zeitlichen Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität gewonnen. So können physikalische und chemische Parameter wie Durchflussraten, Geschwindigkeitskonstanten, Rotationsdiffusionskoeffizienten, Molekulargewichte und Translationsdiffusionskoeffizienten

ermittelt werden.^[71] Erste Berichte stammen von MAGDE *et al.*, die die Bindung von Ethidiumbromid (EtBr) an doppelsträngige DNA untersuchten. Durch Interkalation von EtBr steigt demnach die Fluoreszenz um einen Faktor 20 an.^[83,84] In den 1990er Jahren konnte die Anwendung der FCS durch verbesserte oder neue Messgeräte und Technik (konfokale Anregung, Photonendetektion und Korrelation) ausgebaut werden.^[84,85] Das Prinzip der FCS beruht auf der Messung von Fluoreszenzintensitäten, ausgelöst durch diffundierende Fluorophore in einem definierten Volumen, als Funktion der Zeit.^[86] Diffundiert ein Fluorophor durch den Fokus des Lasers kommt es zum „Ausbruch“ (Burst) von Photonen, ausgelöst durch mehrere Anregungs-Emissions-Zyklen am gleichen Fluorophor. Die durch Assoziations- und Dissoziations-Prozesse, Diffusion, Konformationsänderungen oder photochemische Reaktionen ausgelösten Fluktuationen ($\delta I(t)$, **Formel 1.5**, $I(t)$ = Fluoreszenzintensität) um einen Mittelwert $\langle I(t) \rangle$ werden mittels einer Autokorrelationsfunktion ($G(\tau)$) analysiert (**Formel 1.6**).^[71]

$$\delta I(t) = I(t) - \langle I \rangle \quad \mathbf{1.5}$$

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \mathbf{1.6}$$

Die Autokorrelationsfunktion enthält Informationen über die durchschnittliche Anzahl von Molekülen im Detektionsvolumen (Konzentration), die Triplettzustandsdynamik, die Translations- und Rotationsdiffusion der Fluorophore, Reaktionskinetiken zwischen verschiedenen fluoreszierenden Molekülen und mögliche Photoisomerisationskinetiken^[70].

BOUKARI *et al.* konnten mittels FCS den Translationsdiffusionskoeffizienten eines mit Rhodamin (TAMRA) markierten Tubulin-Dimers messen.^[87] Die Assoziation von Tubulin zur Ausbildung von Mikrotubuli spielt eine entscheidende Rolle bei der Mitose. Der Naturstoff Cryptophycin 1 bindet an Tubulin und wirkt somit zytotoxisch (Chemotherapeutikum). Die Wechselwirkung dieses Depsipeptids mit Tubulin sollte näher untersucht werden, um unter anderem die Größe des entstandenen Tubulinaggregats zu bestimmen. Die Diffusionszeit erhöhte sich um einen Faktor von

2.5, was auf einen hydrodynamischen Radius eines Oktamers hindeutet und nicht dem klassischen Tubulin-Dimer entspricht (siehe **Abbildung 1.14**).^[68,87]

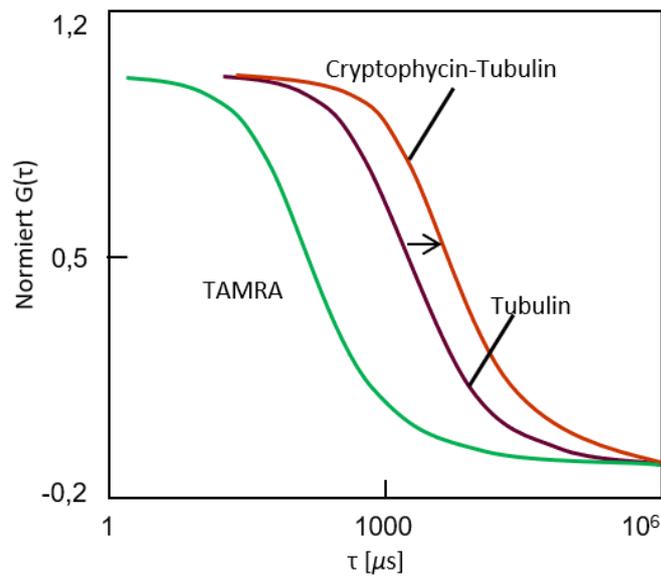


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der normierten experimentellen Fluoreszenzkorrelationskurve von Rhodamin-markiertem Tubulindimer. Gezeigt ist die Auswirkung von Cryptophycin auf die Autokorrelationsfunktion. Die Grafik wurde mit Microsoft PowerPoint in Anlehnung an BOUKARI *et al.* erstellt.^[87]

1.3 Photoaffinitätsmarkierung

Bereits in den frühen 1960er Jahren führten WESTHEIMER *et al.*^[88] das Konzept der Photoaffinitätsmarkierung (*photoaffinity labeling*, PAL) unter Verwendung photoreaktiver Gruppen (PG) ein. Die hierbei nach Acylierung in das Enzym Chymotrypsin integrierte aliphatische Diazogruppe bildete während der Photolyse intramolekulare Quervernetzungen aus.^[88-90] Mit dieser innovativen und leistungsstarken Methode können Protein-Protein-, Protein-Nukleinsäure-, Protein-Cofaktor- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersucht werden. So können beispielsweise neue Bindungsstellen in Proteinen oder unbekanntem Zielstrukturen für Liganden identifiziert werden. Weiterhin können Proteinfunktionen und -strukturen, sowie Konformationsänderungen aufgeklärt werden. Für Photoaffinitätsmarkierungen wird ein Ligand mit einer PG kovalent verknüpft. Dieser bildet unmittelbar bei der Bestrahlung eine reaktive Spezies aus, welche mit dem Zielmolekül ebenfalls eine kovalente Bindung eingeht (vgl. **Abbildung 1.15**).^[89,91]

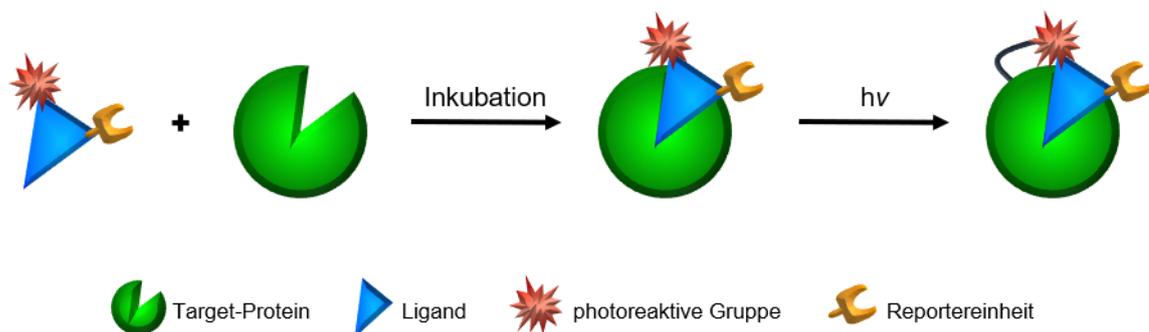


Abbildung 1.15: Schematische Darstellung des allgemeinen Ablaufs einer Photoaffinitätsmarkierung in Anlehnung an SUMRANJIT *et al.*^[90] Die Grafik wurde mit Microsoft PowerPoint erstellt.

Die Charakterisierung des Photoadduktes erfolgt anschließend mittels SDS-PAGE, HPLC und Massenspektrometrie (LC-MS/MS).^[89,91-93] Die Identifizierung eines Photoadduktes, welches beispielsweise durch eine peptidische Photoprobe mit einem Rezeptor gebildet wurde, kann Informationen über drei Ebenen geben. Auf der Proteinebene (SDS-PAGE; LC-MS) kann das intakte Photoaddukt Auskunft über das Bindungsprotein sowie über die Stöchiometrie der Wechselwirkung geben. Nach enzymatischem Verdau und Spaltung in kleine Peptidfragmente kann auf der Oligopeptidebene (LC-MS) die Bindungsstelle detektiert werden. Die abschließende

Analyse des Photoadduktes auf Aminosäureebene (MS/MS) erfolgt schließlich nach Sequenzierung des markierten Proteinfragments (siehe **Abbildung 1.16**).^[94]

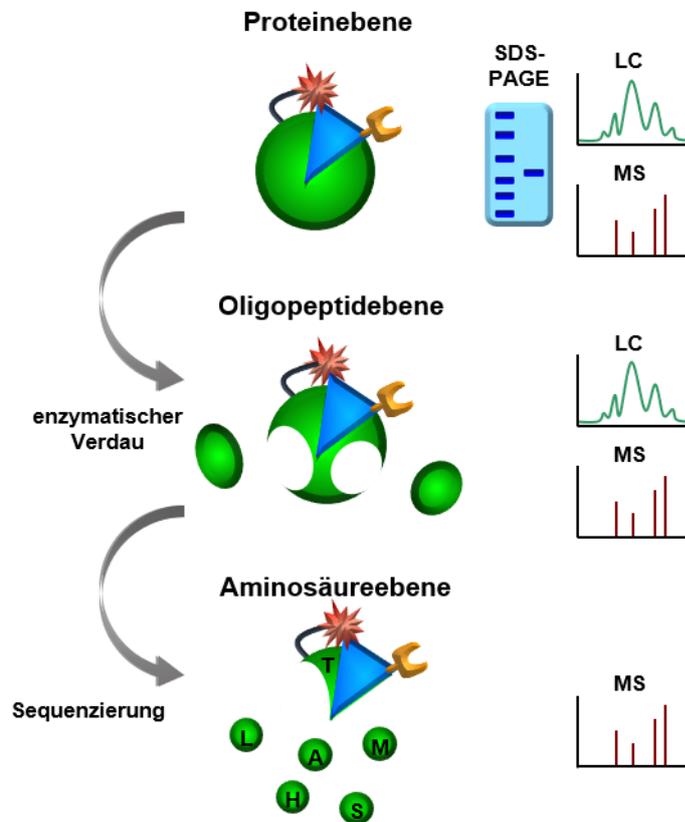


Abbildung 1.16: Charakterisierungsmöglichkeiten eines Photoadduktes auf Proteinebene, Oligopeptid-ebene und Aminosäureebene nach JAHN *et al.*^[94] Die Grafik wurde mit Microsoft PowerPoint erstellt.

1.3.1 Photoaffinitätsproben

Grundsätzlich bestehen Photoaffinitätsproben aus drei wichtigen Einheiten: dem für die Zielstruktur spezifischen Liganden, der photoreaktiven Gruppe und einer Reportereinheit (vgl. **Abbildung 1.15**). Der spezifische Ligand ist dabei entscheidend für die reversible Bindung an das Zielprotein, die photoreaktive Gruppe bildet bei Bestrahlung die kovalente Bindung zum Zielprotein aus und die Reportereinheit dient der Detektion und/oder Isolierung des entstandenen Photoaddukts. Als Reportereinheit können beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe, Isotope oder Moleküle für spezifische Bindungen (z. B. Biotin) eingesetzt werden. Folgende Anforderungen werden an eine ideale Photoaffinitätsprobe gestellt: 1) hohe Ähnlichkeit zum ursprünglichen Liganden, inklusive der Affinität, 2) geringer sterischer Einfluss, 3) Stabilität bei verschiedenen pH-Werten und unter Lichtausschluss, 4) selektive

Aktivierung bei einer Wellenlänge, die die Zielstruktur (z. B. Protein) nicht beeinflusst oder dieser nicht schadet, 5) Reaktionsfähigkeit über jeglicher Art de Bindung mit jedem Rest einzugehen, 6) Ausbildung hoch reaktiver, kurzlebiger Photo-Intermediate während der Bestrahlung, 7) Generierung eines Photoaddukts mit der Zielstruktur, welches bis zur Detektion stabil ist. Diese idealen Kriterien können für gewöhnlich nicht alle erfüllt werden.^[90] Entscheidenden Einfluss und maßgeblich für die Erfüllung der Anforderungen sind dabei die photoreaktiven Gruppen. Die Auswahl kann hier zwischen den bekannten und gut untersuchten funktionellen Gruppen Benzophenonen, Arylaziden und Diazirinen (**Abbildung 1.17**) getroffen werden, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird.^[89,90,95]

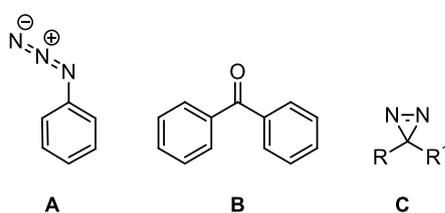
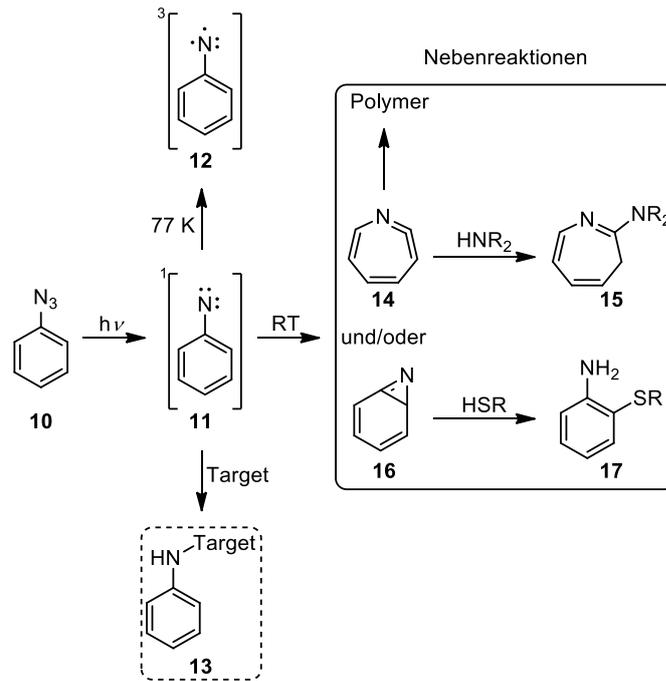


Abbildung 1.17: Photoreaktive Gruppen; **A)** Arylazid, **B)** Benzophenon, **C)** Diazirin.

Arylazide (A, Abbildung 1.17) sind sowohl synthetisch als auch kommerziell sehr leicht zugängliche Verbindungen, welche am häufigsten für PAL, aber auch für allgemeine photochemische und thermische Reaktionen eingesetzt werden. Die Ausbildung des reaktiven Aryl-Nitrens erfolgt bei kurzen Wellenlängen unter 300 nm und kann somit während der Bestrahlung biologische Systeme, wie Proteine, zerstören.^[89,90,96] Nach der Eliminierung von Stickstoff können vier reaktive Spezies entstehen. Zunächst bildet sich das gewünschte Singulett-Nitren (**11**), welches für die photochemische Reaktion erforderlich ist. Des Weiteren erzeugt die Photolyse ein Triplett-Nitren (**12**), das 1*H*-Benzazirin (**16**) sowie das 1,2-Azacycloheptatetraen (**14**) (**Schema 1.2**).

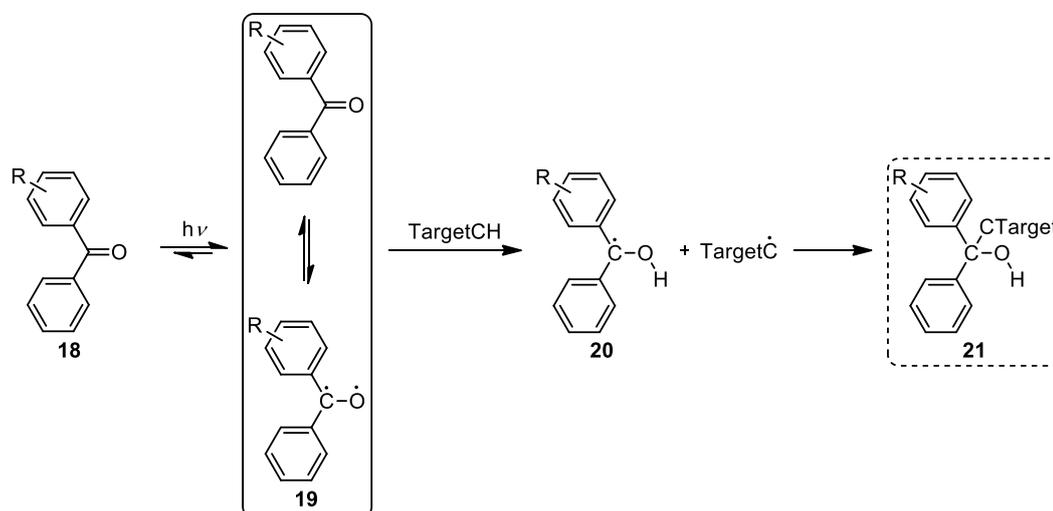


Schema 1.2: Photolyse eines Benzylazids unter Bildung des hochreaktiven Singulett-Nitrens (**11**), welches mit der Zielstruktur (**13**) reagiert oder Nebenprodukte ausbildet.^[97–99]

Das hochreaktive Singulett-Nitren (**11**) ist in der Lage durch eine elektrophile Reaktion mit einer Doppelbindung oder einem Nucleophil die kovalente Bindung zur Zielstruktur auszubilden (**13**). Bei Überwindung der hohen Energiebarriere entsteht der Triplettzustand (**12**). Die Ausbeute der Photomarkierung liegt jedoch häufig weit unter 30%. Hauptursache ist eine schnelle intramolekulare Umlagerung in langlebige und stabile Intermediate wie **14** und/oder **16**. Diese Verbindungen können wiederum mit umliegenden Nucleophilen reagieren und verursachen somit unspezifische Markierungen (**15** und **16**). Dem kann durch die Verwendung von substituierten Arylaziden entgegengewirkt werden.^[90,97–100]

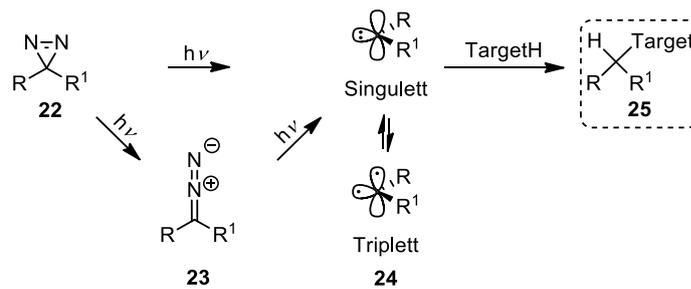
Benzophenone (B, Abbildung 1.17) haben gegenüber den Arylaziden den Vorteil, dass diese mit einer höheren Wellenlänge ($\lambda = 350\text{--}360\text{ nm}$) aktiviert werden und somit die Schädigungen biologischer Proben (v. a. Proteine) verringern. Zudem ermöglichen diese den Einsatz in Zellkulturen oder lebenden Systemen. Weiterhin sind Benzophenone (**18**) sehr stabil und inert in den meisten organischen Lösemitteln und reagieren bevorzugt mit unreaktiven C-H-Bindungen auch in Gegenwart von Nucleophilen und Wasser. Nachteilig hingegen sind die Größe, der hydrophobe Charakter sowie die lange Bestrahlungsdauer, welche zu unspezifischen Markierungen führen kann. Die Ausbildung eines diradikalischen Triplett-Zustands (**19**) des

Benzophenons ist im Gegensatz zu Arylaziden und Diazirinen reversibel, sodass eine erhöhte Markierungseffizienz der Zielstruktur durch mehrere Anregungs-Relaxationszyklen erreicht werden kann.^[90,98,101,102] Die allgemeine Photolyse-Reaktion ist in **Schema 1.3** dargestellt.



Schema 1.3: Reaktion des Benzophenons nach Photolyse.^[102]

Diazirine (C, Abbildung 1.17) stellen die kleinste photoreaktive Gruppe dar. Grundsätzlich sind Diazirine relativ stabil gegenüber sauren oder basischen Bedingungen, Oxidations- und Reduktionsmitteln, sowie Nucleophilen und bei Raumtemperatur. Die Anregung bei Wellenlängen von 350–380 nm hat nur sehr geringen Einfluss auf Biomoleküle.^[89–91] Nach der Bestrahlung bildet sich ein hochreaktives Carben mit der Fähigkeit, schnell mit dem direkten Nachbarn durch Insertion (C-C, C-H, O-H, X-H) eine kovalente Bindung einzugehen. Aufgrund der zwei nicht-bindenden Elektronen ergibt sich für das Carben **24** ein Singulett- oder Triplett-Zustand. Singulett-Aryldiazirine haben den Nachteil, dass neben dem Singulett-Zustand eine langlebige lineare Diazoverbindung **23** durch Photoisomerisierung entsteht (vgl. **Schema 1.4**). Diese kann nur sehr langsam wieder in den Singulett-Zustand übergehen.^[89,91]



Schema 1.4: Photochemische Aktivierung eines Diazirins unter Ausbildung eines hochreaktiven Carbens 24.^[91]

Ein weiterer Nachteil dieser hochreaktiven Spezies ist die schnelle Desaktivierung durch die Reaktion mit Wasser, welche zu geringen Markierungseffizienzen führt. Dies wiederum verringert jedoch unspezifische Markierungen der Zielstruktur, da nur der reversibel gebundene Ligand nach Photoaktivierung eine kovalente Bindung zur Zielstruktur eingehen kann.^[91]

1.3.2 PAL zur Identifizierung von Proteinen, Rezeptoren und Ligandenbindestellen

5-HT₃-Rezeptor: Der ionotrope Serotoninrezeptor 5-HT₃ bestehend aus fünf Untereinheiten, ist selektiv für Natrium- und Kaliumionen und wird durch den Neurotransmitter Serotonin aktiviert. 5-HT₃-Rezeptorantagonisten werden beispielsweise in der Krebs- und Radiotherapie eingesetzt, um Übelkeit und Erbrechen zu unterbinden. Diese konkurrieren mit Serotonin um die orthosterische Bindestelle an der extrazellulären Domäne.^[103] JACK *et al.* modifizierten den Antagonisten Granisetron (**Abbildung 1.18**) unter anderem mit einer Benzophenoneinheit als photoreaktive Gruppe mit dem Ziel, die Orientierung und Bindestelle des Liganden zu verifizieren. Nach MS/MS-Analysen konnte von zwei verschiedenen Derivaten (**26, 27, **Abbildung 1.18****) eine kovalente Bindung zum Met-228 in der Spitze des C-Schleife der orthosterischen Bindestelle identifiziert werden. Dies bestätigte die postulierte Bindung von Serotonin-Antagonisten.^[104,105]

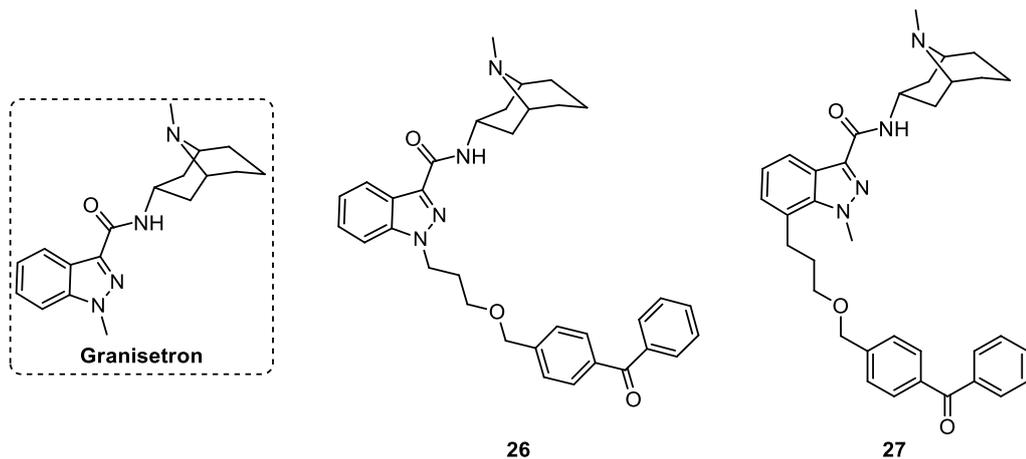


Abbildung 1.18: 5-HT₃-Rezeptorantagonist Granisetron und photoreaktive Derivate (**26**, **27**).

γ -Sekretase: Eine weiteres mittels Photoaffinitätsmarkierung gut untersuchtes Protein ist die γ -Sekretase. Als integrales Membranprotein spielt es eine entscheidende Rolle in der Erforschung der Alzheimerkrankheit, da es zusammen mit der β -Sekretase für die Spaltung des Amyloid-Precursor-Protein (APP) in das Amyloid- β -Protein ($A\beta$) verantwortlich ist.^[106] Der aus vier integralen Proteinen (Presenilin, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2) bestehende Komplex soll nach Möglichkeit nur so adressiert werden, dass beispielsweise die Spaltung des APP unterbunden wird, ohne dass weitere wichtige biochemische Reaktionen beeinflusst werden.^[90] POZDNYAKOV *et al.*^[107] konnten mit Hilfe von PAL-Studien unterschiedliche allosterische Bindestellen verschiedener γ -Sekretase-Modulatoren (GSM) identifizieren. GSM haben im Gegensatz zu γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) den Vorteil, dass nicht die Bildung aller Amyloid- β -Peptide gehemmt wird, sondern es zu einer Verschiebung der spezifischen Schnittstelle kommt. Dadurch werden weniger der toxischen Peptide $A\beta_{42/40}$ gebildet und der Notch-Signalweg wird beispielsweise nicht beeinflusst. Durch Untersuchungen mit dem nichtsteroidalen Entzündungshemmer (NSAID) GSM-1 und dem von „non-NSAID“-abgeleiteten Imidazol GSM E2012 (vgl. **Abbildung 1.19**) konnte einerseits das exakte Zielprotein (Presenilin 1 (PS1-NTF)) ermittelt und andererseits der Mechanismus aufgeklärt werden. So zeigt die photoreaktive Variante des GSM-1 (**28**, **Abbildung 1.19**) eine Interaktion mit PS1 und es kommt in Abwesenheit des Substrats zu Konformationsänderungen im aktiven Zentrum. In weiteren Versuchen konnte bewiesen werden, dass das Imidazol-Derivat (**29**, **Abbildung 1.19**) das gleiche Zielprotein adressiert wie GSM-1, aber eine andere Bindestelle besitzt als die sauren

GSMs (GSM-1), sowie Verbindungen der Sulfonamid-Klasse von GSI und helikalen Peptidinhhibitoren.^[107-109]

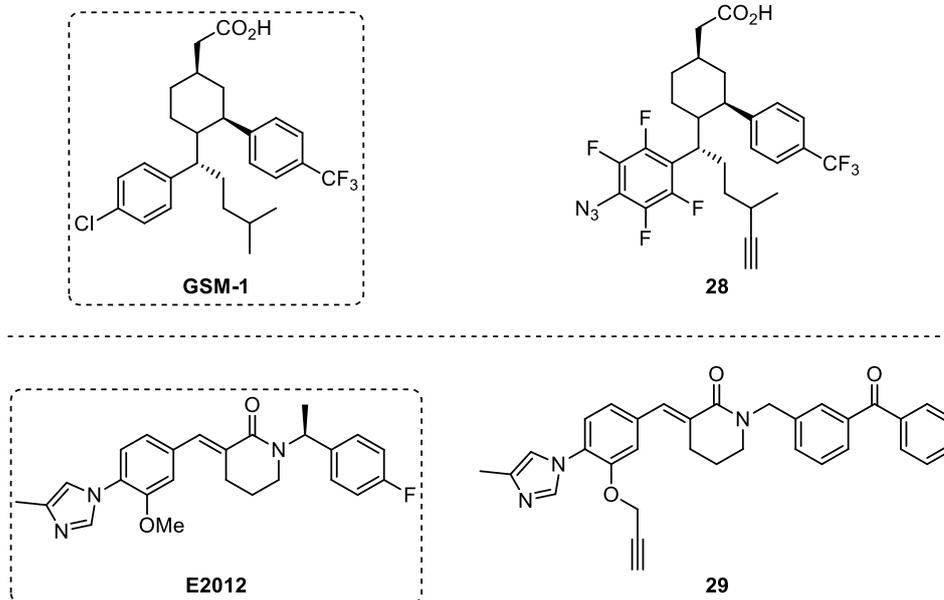


Abbildung 1.19: γ -Sekretase-Modulatoren GSM-1 mit photoreaktiver Azid-Modifikation (**28**) und E2012 mit photoreaktiver Benzophenon-Gruppe (**29**).

nACh-Rezeptor: Der nicotinic Acetylcholinrezeptor (nACh-Rezeptor) gehört wie der Serotoninrezeptor zur Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle mit fünf Untereinheiten, welche je nach Lokalisation und Funktion unterschiedlich zusammengesetzt sein können. Muskuläre und neuronale nACh-Rezeptoren werden durch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) aktiviert und spielen unter anderem bei Muskelkontraktionen sowie bei der Alzheimer- und Parkinsonerkrankung eine wichtige Rolle.^[110,111] Photoaffinitätsmarkierungen ermöglichten es, neben der Agonistenbindestelle diverse Bindestellen für allosterische Modulatoren an den Untereinheiten in der extrazellulären- und der Transmembrandomäne, aber auch innerhalb des Transmembranhelix-Bündels zu ermitteln. Bereits 1993 identifizierten SCHRATTENHOLZ *et al.*^[112] die allosterische Bindestelle des Acetylcholinesterasehemmers Physostigmin (**Abbildung 1.20**) unter Verwendung des intrinsisch photoreaktiven, isotonenmarkierten [³H]-Physostigmins in der extrazellulären Domäne des nACh-Rezeptors. HAMOUDA *et al.*^[110,113] zeigten 20 Jahre später ebenfalls durch Photoaffinitätsmarkierungen und computergestützte Dockingstudien, dass sowohl Physostigmin, als auch Galantamin (**Abbildung 1.20**) die gleiche Bindestelle adressieren und es drei verschiedene Bindestellen gibt: am Eingang der

Transmitter-Bindestelle, im vorderen Bereich des Ionenkanals und an der Schnittstelle der $\delta\beta$ -Untereinheit. Zudem war die zustandsabhängige Bindung des ebenfalls intrinsisch photoreaktiven Ionenkanalblockers Chlorpromazin interessant (**Abbildung 1.20**). Das isotopenmarkierte [^3H]-Chlorpromazin bindet im Ruhezustand in die Kanalregion nahe des cytoplasmatischen Endes und im desensibilisierten Zustand in die Kanalregion nahe des extrazellulären Endes.^[110,114]

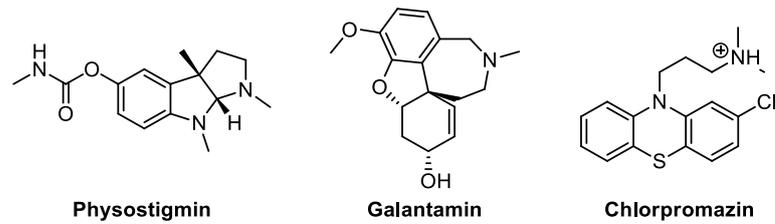


Abbildung 1.20: nACh-Rezeptor-adressierende Substanzen Physostigmin, Galantamin, Chlorpromazin.

2 Motivation und Zielsetzung

Die Amplifizierung des viralen Genoms des Dengue-Virus ist abhängig vom viralen Replikationskomplex, an dem unter anderem die NS2B-NS3-Protease beteiligt ist. Diese stellt somit durch Unterbrechung des Replikationszyklus einen sehr interessanten Angriffspunkt in der medikamentösen Behandlung bei einer DENV-Infektion dar.^[115] Bei der Entwicklung potenzieller Wirkstoffe bzw. Inhibitoren der DENV-NS2B-NS3-Protease werden sowohl kompetitive als auch nicht-kompetitive Inhibitoren tiefgehend erforscht.^[45,116] Dabei ist zusätzlich von Interesse, wie genau diese Verbindungen die Funktion und Struktur der Protease beeinflussen. So konnte anhand von Kristallstrukturen gezeigt werden, dass sowohl das Substrat, als auch kompetitive Inhibitoren die sogenannte geschlossene und aktive Konformation der Protease stabilisieren.^[36,47] Im Gegensatz dazu scheinen nicht-kompetitive Inhibitoren eine offene und inaktive Konformation zu begünstigen (vgl. **Abbildung 2.1**).^[44]

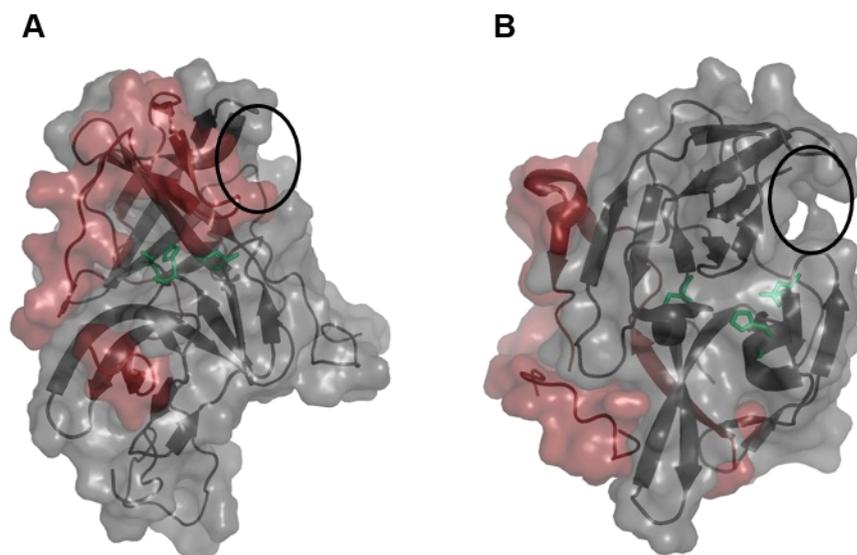


Abbildung 2.1: DENV-NS2B-NS3-Protease. **A)** Geschlossene und aktive Konformation (PDB: 2M9P^[47]), **B)** Offene und inaktive Konformation (PDB: 2FOM^[44]). NS2B-Cofaktor (rot), NS3-Protease (grau), aktives Zentrum (grün, His51, Asp75, Ser135). Das schwarze Oval zeigt die Lage der allosterischen Tasche.

Es gibt bislang keine eindeutige Kristallstruktur^{c[51]}, in der ein nicht-kompetitiver Inhibitor in der allosterischen Tasche gebunden ist. Die bisherigen Erkenntnisse, dass

^c Die Kristallstrukturen (PDB:6M00, 6M01, 6M02) sind umstritten, da nicht eindeutig klar ist, ob die Elektronendichte auf den niedermolekularen Inhibitor oder Teile des Proteins zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt 1.1.3.3).^[52,53]

die offene Konformation durch nicht-kompetitive Inhibitoren stabilisiert werden, beruhen auf einem Luciferase-Assay.^[117] Die offene Konformation wird jedoch sehr häufig auch bei anderen flaviviralen Proteasen ohne Inhibitor vorgefunden (DENV: PDB 2FOM^[44], ZIKV: PDB 5GXJ^[118]). NMR-Studien belegen zudem ein Vorhandensein beider Konformationen in Lösung (20 mM HEPES pH 7.3, 2 mM DTT), wobei die geschlossene bevorzugt ist.^[49] Für einen experimentellen Beweis, welche Konformation durch die verschiedenen Liganden begünstigt wird, kann die smFRET-Spektroskopie als weitere Methode in Betracht gezogen werden. Diese kann darüber hinaus Aufschluss über Parameter der Kinetik und Thermodynamik, wie z. B. Assoziations- und Dissoziationskonstanten bei Konformationsänderungen geben.^[119,120] Diese vielversprechende leistungsstarke Technik wurde für die Untersuchung der DENV2-NS2B-NS3-Protease bisher noch nicht berücksichtigt. **Die Entwicklung einer Strategie, die zum Ziel hat, die Protease sowie nicht-kompetitive Inhibitoren für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zugänglich zu machen, ist Bestandteil dieser Dissertation.** Dementsprechend sollten verschiedene nicht-kompetitive Inhibitoren, wie beispielsweise die von Wu *et al.*^[66] bekannte Verbindung **8** (Abbildung 2.2) so modifiziert werden, dass eine einfache und schnelle Umsetzung mit einem Fluoreszenzfarbstoff im Mikromaßstab ermöglicht wird.

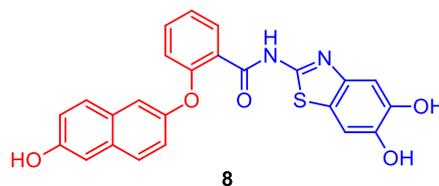


Abbildung 2.2: Nicht-kompetitiver Inhibitor **8** mit modifizierbarem Bereich (rot) und dem für die Bindung an die Protease essenziellen Molekülbereich (blau).

Diese Verbindungen können beispielsweise durch die Einführung von Alkinen oder Thiolen in einer „Click-Reaktion“ mit dem Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt werden, wobei die Affinität zur Protease möglichst erhalten bleiben sollte. Ferner sollte eine Methode etabliert werden, welche eine effiziente Fluoreszenzmarkierung der NS2B-NS3-Protease für Einzelmoleküluntersuchungen gewährleistet. Dies erfordert eine spezifische Markierung mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff pro Protease beziehungsweise mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Donor und Akzeptor) für

FRET-Untersuchungen. Daher sollten in die natürliche Aminosäuresequenz Cysteine einkloniert werden, um eine statistische Markierung zu ermöglichen. Durch die Etablierung optimaler Markierungsbedingungen an der Wildtyp-Protease sollten zudem unspezifische Markierungen anderer Aminosäuren (z. B. Lysine) verringert bzw. verhindert werden.

Die Hypothese der Bindung von potenziellen nicht-kompetitiven Inhibitoren in die postulierte, allosterische Tasche konnte von MILLIES *et al.*^[45] mittels Dockingstudien, zielgerichteten Mutagenesen sowie fluorimetrischer Enzymassays weiter untermauert werden. Eine ebenfalls aussagekräftige experimentelle Methode, um diese Hypothese als Alternative zu einer Kristallstruktur mit Inhibitor endgültig zu bestätigen, ist die Photoaffinitätsmarkierung. Eine Studie von JACK *et al.*^[105] bestätigte beispielsweise die über Docking- und Mutagenese-Studien postulierte orthosterische Bindestelle des Antagonisten Granisetron am 5-HT₃-Rezeptor mittels Photoaffinitätsmarkierung. **Durch die Herstellung einer kleinen Substanzbibliothek verschiedener mit photoreaktiven Gruppen (z. B. Benzophenonen oder Diazirinen) versehenen nicht-kompetitiven Inhibitoren sollte die Grundlage für eine Photoaffinitätsmarkierung mit der NS2B-NS3-Protease geschaffen werden.** Um eine effiziente Photoaffinitätsmarkierung zu erzielen, wurde eine Untersuchung des kinetischen Profils sowie der Reaktivität nach einer Photolyse mit UV-Strahlung angestrebt, bevor ein ausgewählter Inhibitor mit der NS2B-NS3-Protease umgesetzt werden sollte.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Fluoreszenzmarkierung

Für Untersuchungen von durch Ligandenbindung ausgelösten Konformationsänderungen sowie der Assoziations- und Dissoziationskinetik der DENV2-NS2B-NS3-Protease sollten im Rahmen dieser Arbeit sowohl die Protease als auch ein potenzieller Inhibitor für FRET bzw. smFRET-Messungen zugänglich gemacht werden. Die Messungen und Auswertungen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um [REDACTED] am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz^d. Für die Fluoreszenzmarkierungen wurden die Farbstoffe ATTO 488, ATTO 647N und Cy5 verwendet (**Abbildung 3.1**).

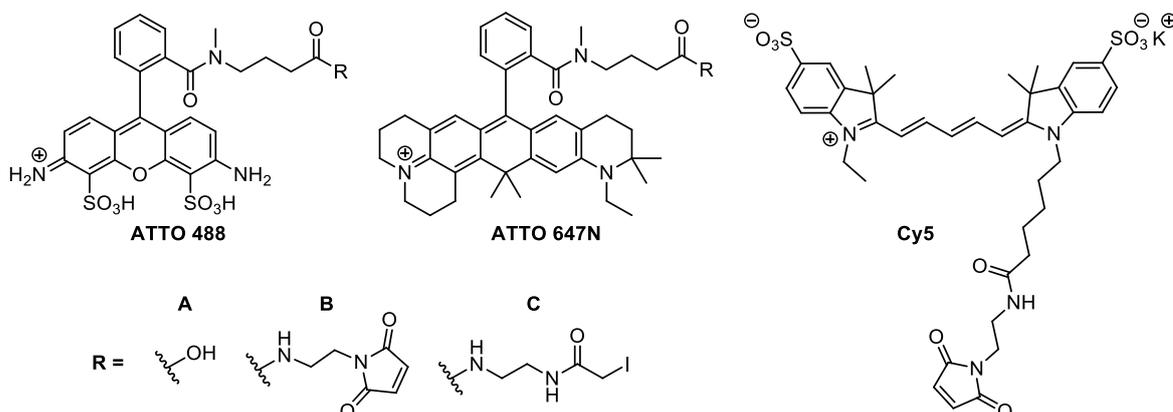


Abbildung 3.1: Fluoreszenzfarbstoffe für die Markierung der DENV2-NS2B-NS3-Proteasen. ATTO-Farbstoffe mit Carbonsäure- (A), Maleimid- (B), Iodacetamid-Funktionalität (C). Cy5 wurde nur mit Maleimid-Funktionalität eingesetzt.

Die ATTO-Farbstoffe eignen sich laut Hersteller *ATTO-TEC GmbH* besonders gut für die Detektion von Einzelmolekülen und für die hochauflösende Mikroskopie. Wichtige Eigenschaften sind in **Tabelle 3.1** zusammengefasst (optische Eigenschaften vgl. Tabelle unter Abschnitt 7.1.3). ATTO 647N ist Cy5 bezüglich der Fluoreszenzquantenausbeute überlegen (ATTO 647N $\eta_{fl} = 65\%$, Cy5 $\eta_{fl} = 32\%$)^[121] und war somit erste Wahl für die Markierung mit einem Akzeptorfarbstoff. ATTO 488 diente als Donormolekül für die durchgeführten FRET-Untersuchungen.

^d Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von [REDACTED]

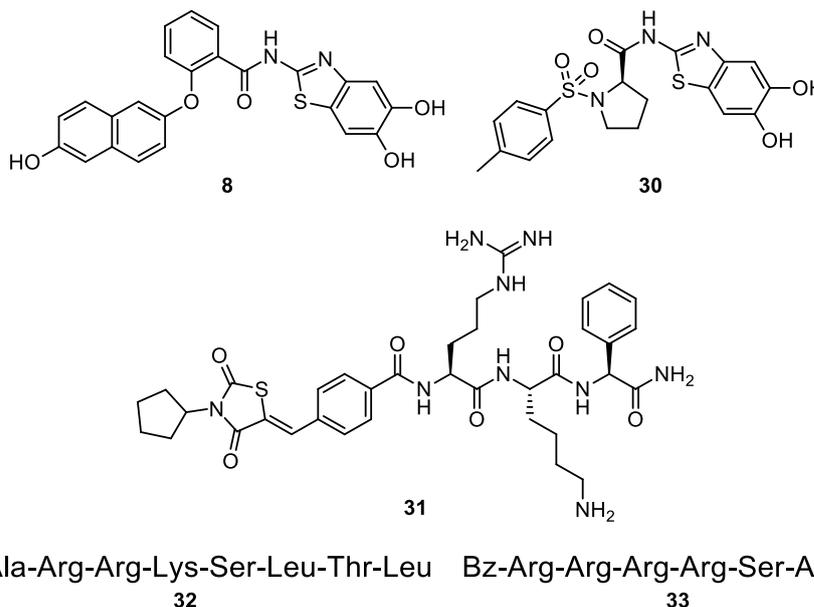
Tabelle 3.1: Wichtige Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Farbstoff	Eigenschaften
Cy5 ^[122]	hohe Photostabilität, pH Bereich 3–10, sehr hydrophil
ATTO 647N ^[121]	hohe Fluoreszenzquantenausbeute, hohe thermische und photochemische Stabilität, starke Absorption, pH-Bereich 2–11, mäßig hydrophil
ATTO 488 ^[121]	hohe Fluoreszenzquantenausbeute, hohe photochemische Stabilität, starke Absorption, pH-Bereich 2–11, sehr hydrophil

Weiterhin wurden die in **Tabelle 3.2** aufgelisteten Liganden für fluorimetrische Enzymassays und/oder Fluoreszenzspektroskopische Messungen eingesetzt. Der nicht-kompetitive Inhibitor **8** wurde von [REDACTED] entwickelt und bereitgestellt, sowie im Rahmen dieser Doktorarbeit neu synthetisiert^e. Verbindung **30** wurde von [REDACTED] als nicht-kompetitiver Inhibitor hergestellt. Das modifizierte Tripeptid **31** wurde als kompetitiver Inhibitor von der Arbeitsgruppe von [REDACTED] zur Verfügung gestellt. Die Substrate **32** und **33** wurden kommerziell von der Firma *GenScript* erworben.

^e Die Synthese ist literaturbekannt und wird in dieser Arbeit nicht näher aufgeführt.^[66]

Tabelle 3.2: Relevante Inhibitoren und Liganden, die einen Einfluss auf die Konformation der DENV2-NS2B-NS3-Protease haben.



#	Funktion	IC ₅₀ [μM] (WT)
8	nicht-kompetitiver Inhibitor	4.20 ± 0.44 ^[66]
30	nicht-kompetitiver Inhibitor	19.7 ± 1.50 ^[45]
31	kompetitiver Inhibitor	0.60 (K _i = 0.4 μM) ^[123]
32	Substrat	-
33	Substrat	-

3.1.1 Fluoreszenzmarkierungen der DENV-NS2B-NS3-Protease

Die verwendeten NS2B-NS3-Proteasen besitzen im Vergleich zur nativen Protease einen kovalent gebundenen Glycin-Linker (Gly₄-Ser-Gly₄), der zur Stabilität z. B. gegenüber Autoproteolyse beiträgt. Für die Isolierung der Protease nach Expressierung in *E. coli*-Zellen befindet sich am NS2B-CoFaktor N-Terminal ein Hexahistidin-Rest (His₆-Tag).

3.1.1.1 Voruntersuchungen

In ersten Versuchen sollte eruiert werden, ob sich die DENV-NS2B-NS3-Protease grundsätzlich für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen eignet. Hierfür wurden Ensemblemessungen durchgeführt, bei denen simultan eine Vielzahl von Fluorophoren gemessen und die Informationen über das Ensemble gemittelt wurden. Somit werden keine Informationen über das Verhalten einzelner Proteasen, sondern ein Mittelwert über das Gesamtverhalten vieler Proteasen erhalten. Treten kurzzeitige

Veränderungen oder Unterschiede der Fluoreszenzeigenschaften auf, so können diese nicht detektiert werden.

Im Vorfeld dieser Arbeit (während der Diplomarbeit) wurde die DENV3-NS2B-NS3-Protease^f für verschiedene Experimente genutzt, bevor später die DENV2-NS2B-NS3-Protease selbst exprimiert und verwendet wurde. Die erstgenannte Protease wurde in Zusammenarbeit mit [REDACTED] mit einem *Monolith NT Protein Labeling kit RED-NHS* von *NanoTemper Technologies* mit dem Farbstoff NT-647-NHS markiert. Dies führt zu einer unspezifischen Markierung von primären Aminen (z. B. Lysine) an der Oberfläche der Protease, wobei die genaue Anzahl der Fluorophore nicht bekannt ist. [REDACTED]^g untersuchte im Rahmen ihres Forschungsmoduls die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften dieser Protease in An- und Abwesenheit von Inhibitoren.^[124] Verwendet wurden hierfür bekannte kompetitive (z. B. der Proteaseinhibitor Aprotinin) und nicht-kompetitive (**8, Tabelle 3.2**) Inhibitoren. Letztgenannter diente zu Beginn des Projektes als Leitstruktur für einen nicht-kompetitiven Inhibitor. Dabei wurden mittels Ensemble-Messungen Emissions- und Anregungsmaxima, Fluoreszenzlebensdauer und Rotationskorrelationszeiten bestimmt. Ebenfalls wurde Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) durchgeführt und die Korrelationsfunktionen berechnet, um das Diffusionsverhalten der Protease näher zu beschreiben. Grundsätzlich gaben die Messungen erste Hinweise darauf, dass die NS2B-NS3-Protease unterschiedliche Konformationen eingeht und die Inhibitoren das Emissionsmaximum des Farbstoffes minimal nach Blau verschoben. Es wurde daher erwartet, dass durch weitere Experimente und Optimierung die Konformationsänderungen im Detail untersucht werden können.

3.1.1.2 Einfach markierte DENV2-NS2B-NS3-Proteasen

Für weitere Untersuchungen im Bereich der Ensemblesmessungen, vor allem aber für die Einzelmolekülspektroskopie, war es erforderlich die Protease mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff-Molekül zu markieren sowie die Möglichkeiten einer Immobilisierung via His₆-Tag zu evaluieren. Als vorteilhaft erwies sich hierbei, dass die

^f Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von [REDACTED]

^g Genauere Informationen zu den Messbedingungen und Versuchsaufbau können dem Modulbericht entnommen werden.^[124]

DENV2-NS2B-NS3-Protease in der nativen Aminosäuresequenz keine Cysteine besitzt und eine gezielte Punktmutation die Markierung mit einem einzelnen Farbstoffmolekül ermöglicht. Um Funktion und Faltung der Protease zu erhalten, wurde für die Mutation eine Aminosäure gewählt, welche sich einerseits weit entfernt vom aktiven und allosterischen Zentrum befindet und andererseits ähnliche physikochemische Eigenschaften besitzt. In Zusammenarbeit mit [REDACTED] wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese (*site directed mutagenesis*) Glycin 14 zu Cystein 14 mutiert (vgl. **Abbildung 3.2**). Dieses befindet sich in einer Schleifen-Region der NS3-Protease.

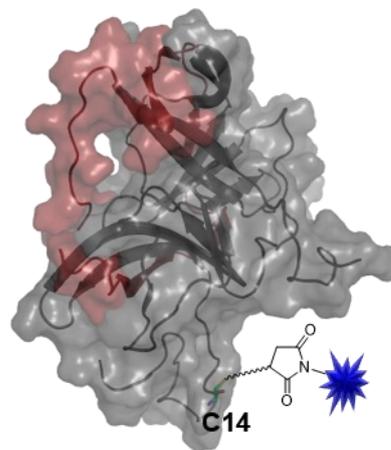


Abbildung 3.2: DENV2-NS2B-NS3-G14C; Die Grafik wurde mit PyMOL und Microsoft PowerPoint erstellt, basierend auf der NMR-Struktur PDB: 2M9P^[47] (geschlossen). NS3-Protease (grau), NS2B-Co-Faktor (rot), ATTO 647N (blau, schematisch).

Die ortsspezifische Mutagenese mittels Polymerasekettenreaktion lieferte das gewünschte Plasmid zur Expression der NS2B-NS3-G14C-Protease in kompetenten BL21Gold (D3)-Zellen. Als Vorlage diente hierbei das Plasmid pET-15b, welches die Sequenz der Wildtyp-Protease enthält. Im Anschluss an die Expression wurde das erhaltene Zellpellet lysiert und zentrifugiert, sodass der Überstand mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte. Da für die Fluoreszenzmarkierung mit dem Maleimid-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647N ein pH-Optimum von 7.0–7.5 vorgegeben ist, wurde ein Elutionspuffer mit pH = 7.0 verwendet. Ein Teil der erhaltenen Proteinlösung (vgl. Abschnitt 7.3.3) wurde mit einem 2.5-fachen molaren Überschuss an ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff versetzt und zwei Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Da in einem ersten Versuch das farbstoffmarkierte Protein beim Auftragen

auf eine Säule für Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) ausgefallen war oder eine starke Wechselwirkung des überschüssigen Fluoreszenzfarbstoffs mit der Säule stattgefunden hatte, wurde ein Dialyseschritt eingeführt. Dieser wurde ebenfalls genutzt, um bei der Hälfte der farbstoffmarkierten Proteinlösung den His₆-Tag mittels Thrombinverdau zu entfernen. Anschließend wurde das Gemisch mit Thrombin und Protease per umgekehrter Nickel-Affinitätschromatographie voneinander getrennt und die vereinigten, auf 3 mL konzentrierten Elutionsfraktionen auf eine Superdexsäule (75 10/300 GL) überführt. Die Fraktion ohne Thrombinverdau konnte nach der Dialyse direkt mittels GPC gereinigt werden. Es wurden 2.4 µM DENV2-NS2B-NS3-G14C plus ATTO 647N ohne His₆-Tag (DOL = 21%) und 4.6 µM DENV2-NS2B-NS3-G14C plus ATTO 647N mit His₆-Tag (DOL = 22%) erhalten. **Abbildung 3.3** zeigt die UV-Chromatogramme der markierten G14C-Mutante ohne (**A**) und mit (**B**) His₆-Tag. Beide weisen eine erfolgreiche Markierung des Proteins auf, da das UV/Vis-Signal bei 644 nm (**Abbildung 3.3, A, B**: blau) den analogen Verlauf hat, wie die proteinspezifische Wellenlänge bei 280 nm (**Abbildung 3.3 A, B**: grün). Der Peak im markierten Bereich entspricht der Protease, wurde zusammengeführt und mittels SDS-PAGE überprüft. Die SDS-PAGE (**Abbildung 3.3, C** links) zeigt nach Coomassie-Färbung die charakteristische Bande der Protease bei ca. 35 kDa. Es ist bereits bekannt, dass dies nicht dem eigentlichen Molekulargewicht von rund 28 kDa entspricht und sich möglicherweise ein größerer Protein-SDS-Komplex bildet, der langsamer durch das Gel diffundiert. Ebenfalls ist erkennbar, dass der Verdau mit Thrombin erfolgreich war, da die G14C-Mutante ohne His₆-Tag etwas niedriger liegt. Der Fluoreszenzscan der SDS-PAGE ist in **Abbildung 3.3 (C** rechts) dargestellt. Der Scan wurde vor der Färbung mit Coomassie durchgeführt, da dieses ebenfalls in dem erforderlichen Wellenlängenbereich absorbiert. Die markierten Proteine weisen eine deutliche Bande bei der erwarteten Proteingröße auf. Des Weiteren zeigt die sehr sensitive Methode eine Markierung von größeren und kleineren Proteinbestandteilen, die bei der GPC nicht abgetrennt wurden. Weiterhin ist erkennbar, dass die nicht-markierte G14C-Mutante im Fluoreszenzscan nicht erfasst wird.

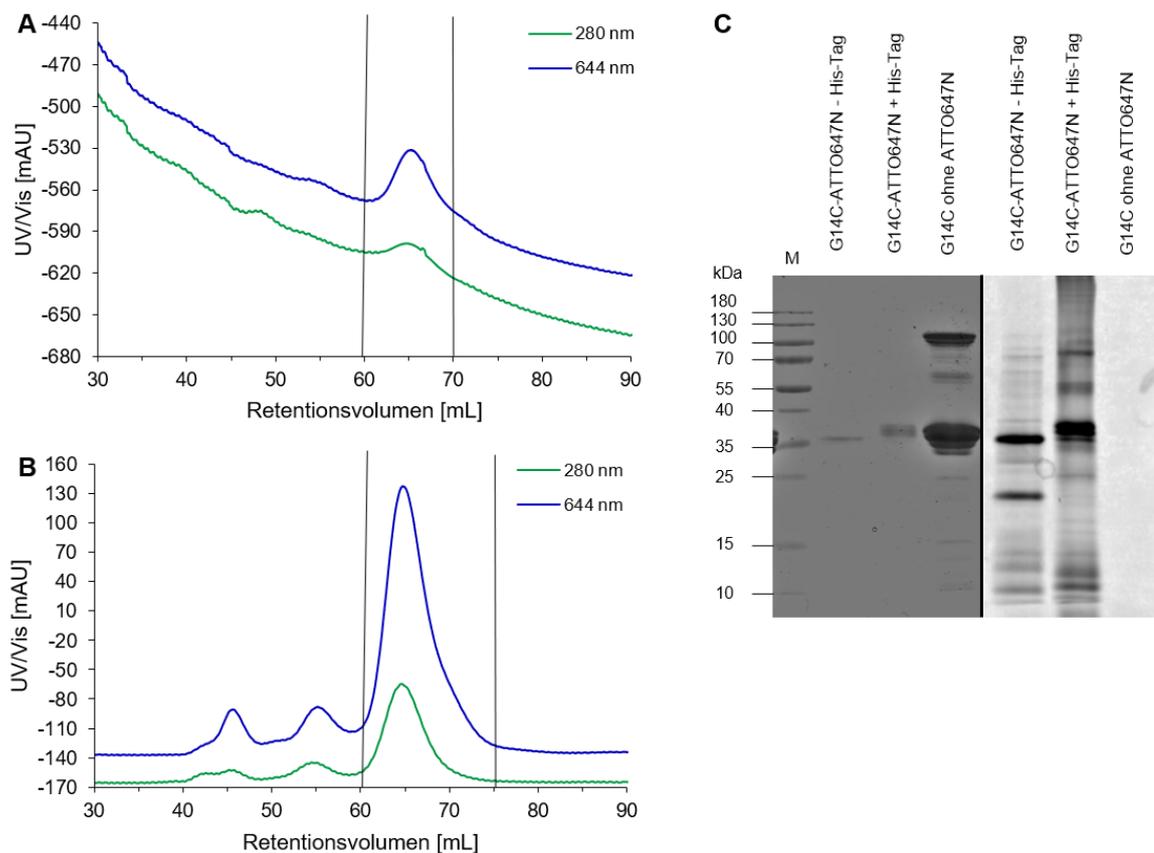


Abbildung 3.3: NS2B-NS3-G14C-Mutante; **A)** NGC™-UV/Vis-Chromatogramm nach GPC der NS2B-NS3-G14C Mutante ohne His₆-Tag nach Markierung mit ATTO 647N und **B)** der NS2B-NS3-G14C Mutante mit His₆-Tag nach Markierung mit ATTO 647N. Gezeigt sind die UV/Vis-Signale bei 280 nm (Protein, grün) und 644 nm (ATTO 647N, blau). **C)** SDS-PAGE nach GPC *links:* Coomassie gefärbt, *rechts:* Fluoreszenzscan (TyphoonTRIO+) vor Coomassie-Färbung.

führte im Rahmen ihrer Diplomarbeit diverse Untersuchungen bezüglich der spektroskopischen Eigenschaften der markierten NS2B-NS3-Protease, des freien Farbstoffes ATTO 647N (vgl. **Abbildung 3.1**) und des Inhibitors **8** (vgl. **Tabelle 3.2**) durch.^[125] Im Folgenden werden die relevanten Ergebnisse kurz zusammengefasst^h. Um den Einfluss der Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes ATTO 647N an die Protease auf dessen spektrale Eigenschaften zu untersuchen, wurden sowohl Absorptions- und Emissionsspektren, als auch die Fluoreszenzlebensdauer gemessen. Die Absorptionsspektren der markierten Protease und des freien Farbstoffes zeigen Absorptionsmaxima, die im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmen. Der Extinktionskoeffizient am Maximum ist für den

^h Genaue Versuchsdurchführungen und detaillierte Ergebnisse können der Diplomarbeit entnommen werden.^[125]

freien Farbstoff ($3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ca. viermal größer als der der markierten Protease ($0.85 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ursache hierfür könnte das Vorhandensein nicht-markierter Proteasen im Gemisch sein. Die Fluoreszenzspektren sowie die Fluoreszenzlebensdauer stimmen ebenfalls annähernd überein. Die Protease hat somit keinen signifikanten Einfluss auf den angebrachten Farbstoff ATTO 647N. Der zu Beginn der Arbeit untersuchte Inhibitor **8** zeigte ein stark konzentrations- und lösemittelabhängiges Verhalten bezüglich Absorption und Fluoreszenz. Es kann ausgeschlossen werden, dass es zu einem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen der markierten Protease und dem unmarkierten Inhibitor **8** kommt. Ein weiterer wichtiger Aspekt für zukünftige Untersuchungen von einzelnen Proteasen durch z. B. smFRET war eine Immobilisierung der Protease mittels des bereits vorhandenen His₆-Tags zu etablieren. Dies ist notwendig, da Proteine grundsätzlich an unterschiedlichsten Oberflächen aufgrund von van-der-Waals-Wechselwirkungen, Coulomb-Wechselwirkungen und hydrophoben Effekten adsorbieren.^[126] Diese unspezifische Adsorption kann zu Veränderungen in der Sekundärstruktur führen und somit einen Funktionsverlust nach sich ziehen, beispielsweise wenn das aktive Zentrum nicht zugänglich ist.^[127] Somit ist es erstrebenswert, die Protease durch eine spezifische Anbindung an die Oberfläche und damit möglichst ohne Funktionsverlust zu immobilisieren, da unter anderem die Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Protease auf Einzelmolekülebene untersucht werden sollen. In **Abbildung 3.4 (A)** ist schematisch dargestellt, wie die Protease über den His₆-Tag an einer modifizierten Glasoberfläche immobilisiert wird. Die selektive Fixierung über den His₆-Tag kann anhand konfokaler Fluoreszenzbilder verdeutlicht werden. So zeigt die markierte Protease mit His₆-Tag **(B)** eine wesentlich höhere Belegungsdichte im Vergleich zur Protease ohne His₆-Tag **(C)**.

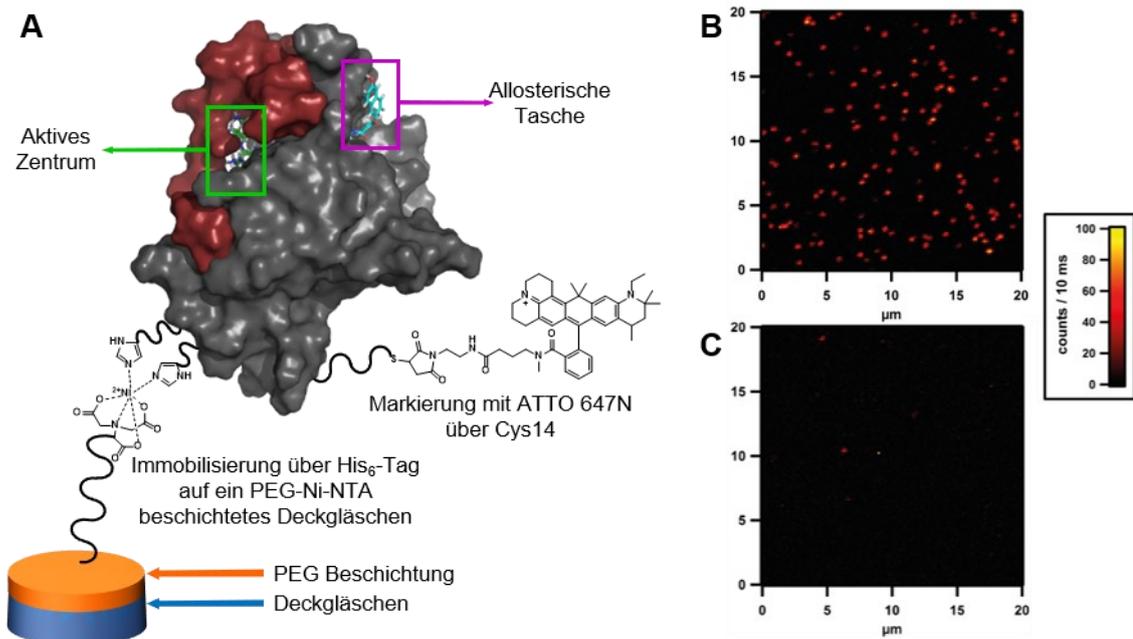


Abbildung 3.4: **A)** Schematische Darstellung der immobilisierten Protease (PDB:2M9P^[47]) auf einem PEGylierten Deckglaschen (*MicroSurface Inc.*) über einen Ni²⁺-NTA-Anker und His₆-Tag. NS3-Protease (grau), NS2B-Co-Faktor (rot, Grafik erstellt mit Microsoft PowerPoint und PyMOL). **B)** Konfokales Fluoreszenzbild eines mit der ATTO 647N markierten NS2B-NS3-G14C-Protease mit His₆-Tag belegten Deckglaschens, **C)** Konfokales Fluoreszenzbild eines mit der ATTO 647N markierten NS2B-NS3-G14C-Protease ohne His₆-Tag belegten Deckglaschens. Die Fluoreszenzbilder wurden von [REDACTED] aufgenommen und zur Verfügung gestellt.

Es stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzintensität von ATTO 647N durch den nicht-kompetitiven Inhibitor **8** stark einbrach (vgl. Abschnitt 3.1.2.2). Im Ensemble war es dennoch möglich, Änderungen der Fluoreszenzparameter durch Zugabe von Verbindung **8** zu beobachten. Auf Einzelmolekülebene konnten hingegen Änderungen der Fluoreszenzparameter durch Verbindung **8** nicht ausgewertet werden, da der Einbruch der Fluoreszenzintensität zu groß war. Daher sollte die NS2B-NS3-G14C-Protease alternativ mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert werden. Die Fluoreszenzintensität des freien Fluoreszenzfarbstoffes Cy5 wurde im Vergleich zu ATTO 647N nur wenig beeinflusst.^[128] Allerdings konnten bei Ensemble-Messungen keine Änderungen der spektralen Eigenschaften durch Wechselwirkungen zwischen der markierten Protease und dem nicht-kompetitiven Inhibitor **8** detektiert werden. Dieses System eignet sich daher nicht für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von einzelnen Proteasemolekülen.^[129] In einem weiteren Ansatz wurde eine andere Einzelmutante NS2B-NS3-S79C sowohl

mit ATTO 647N als auch mit Cy5 markiert. Die von [REDACTED] durchgeführten Experimente mit den Inhibitoren **31** (NS2B-NS3-S79C ATTO 647N und Cy5) und **8** (NS2B-NS3-S79C Cy5) zeigten ebenfalls keine Änderungen der spektralen Eigenschaften des an die Protease gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes nach Zugabe der Inhibitoren. Der Fokus wurde daraufhin auf die im Folgenden beschriebenen doppelt markierten Mutanten gelegt (Abschnitt 3.1.1.4). Zuvor wird auf die Optimierung der Bedingungen für die Fluoreszenzmarkierung eingegangen.

3.1.1.3 Optimierung der Fluoreszenzmarkierung

Eine mögliche unspezifische Markierung der unter Abschnitt 3.1.1.4 beschriebenen DENV2-NS2B-NS3-Doppelmutanten kann den Energietransfer zwischen den kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen stören und gegebenenfalls zu einer Verbreiterung der Verteilung der Energietransfer-Effizienz führen. Es sollte daher untersucht werden ob die Maleimid-Farbstoffe auch unspezifisch über hydrophobe Wechselwirkungen oder kovalent mit anderen nucleophilen Aminosäuren wie z. B. Lysin oder Histidin reagieren.^[130,131] Zunächst wurde die DENV2-Wildtyp-Protease (DENV2-NS2B-NS3-WT-1), welche keine natürlichen Cysteine enthält, mit dem Markierungs-Puffer 2 (vgl. Abschnitt 7.1.1) auf einen pH-Wert von 6.8 eingestellt. Die Markierung erfolgte mit einem 1.8-fachen molaren Überschuss ATTO 647N-Maleimid und einem 1.5-fachen molaren Überschuss ATTO 488-Maleimid. Die Dialyse wurde mit Dialyse-Puffer 2 (pH 8) durchgeführt und anschließend das Dialysat mittels GPC gereinigt. Laut der ermittelten Markierungseffizienz (0.73% ATTO 647N und 1.33% ATTO 488) enthielt die Proteinlösung noch einen minimalen Anteil an freiem oder unspezifisch gebundenem Farbstoff. Im Fluoreszenzscan konnte nur bei der mit Fluoreszenzfarbstoff umgesetzten Protease eine schwache, relativ unscharf Bande bei den Wellenlängen 532 nm und 633 nm erfasst werden (s. Anhang **Abbildung 11.1**). Eine genauere Betrachtung durch FCS-Messungen (durchgeführt von [REDACTED]) bestätigte das Vorhandensein beider Farbstoffe. Weiterhin konnte die unspezifische Haftung an der Protease mittels einer Autokorrelationsfunktion (Donor und Akzeptor) gezeigt werden. Zudem gab es Hinweise auf einen möglicherweise stattfindenden Energietransfer zwischen den unspezifisch an der Protease gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen. Es ist jedoch nicht geklärt, ob der Energietransfer signifikant ist und ob signifikante Mengen Fluoreszenzfarbstoff an der Protease haften und wie

die unspezifische Markierung stattfindet. Eine Möglichkeit sind hydrophobe Wechselwirkungen des mäßig hydrophilen ATTO 647N mit der Proteinoberfläche oder ionische Wechselwirkungen der geladenen Farbstoffe mit der je nach pH-Wert unterschiedlich geladenen Proteinoberfläche. Diese Wechselwirkungen sollten durch mehrere Waschschriffe, gegebenenfalls durch Zusätzen wie Tenside (CHAPS, Tween20) oder Lösemittel (DMSO), weiter verringert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die kovalente Bindung der Farbstoffe an nucleophile Aminosäuren wie Lysin oder Histidin, welche pH-abhängig deprotoniert vorliegen, oder an die pH-unabhängig nucleophile Aminosäure Methionin.^[130] Bei dem für die Markierung gewählten pH-Wert (6.8) sollten Thiolgruppen der Cysteine ausreichend deprotoniert vorliegen und kovalent mit den Maleimiden reagieren.^[121] Lysin und Histidin liegen hingegen weitestgehend protoniert vor und sind somit nicht reaktiv. Die Dialyse wurde bei pH 8 über mehrere Stunden durchgeführt, wodurch eventuell Lysin und Histidin mit den Fluoreszenzfarbstoffen reagiert haben könnten. Daher wurde zunächst überprüft, ob eine Dialyse bei pH 6.8 schon zum gewünschten Erfolg führt. Zusätzlich wurde neben dem bisher verwendeten Tris-HCl-Puffersystem ein zweites Puffersystem untersucht. Für die Markierung mit Maleimiden wurde der von ATTO-TEC empfohlene PBS-Puffer (pH 7.4) verwendet. Weiterhin wurde der Farbstoff Cy5-Maleimid als Alternative zu ATTO 647N untersucht. Dieser ist wesentlich hydrophiler, wodurch mögliche hydrophobe Wechselwirkungen verringert werden können und freier Farbstoff durch Dialyse leichter entfernt werden kann. Die Bedingungen der Markierungsansätze sind in **Tabelle 3.3** zusammengefasst (vgl. **Abbildung 11.2**. Anhang).

Tabelle 3.3: Markierungsbedingungen der Wildtyp-Proteasen 1–5.

Ansatz mit	Markierungsbedingungen	Reinigungsbedingungen	DOL (%)
	Farbstoffe (molarer Überschuss)	Puffer	
WT-1	ATTO 647N (1.8) ATTO 488 (1.5)	Tris-HCl pH 6.8	Dialyse über Nacht (Tris-HCl, pH·8) 0.7 1.3
WT-2	Cy5 (6.6)	Tris-HCl pH 7.0	Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse ün (Tris-HCl, pH·7.0) 0.6
WT-3	ATTO 647N (10) ATTO 488 (8.1)	Tris-HCl pH 7.0	Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse ün (Tris-HCl, pH·7.0) 1.7 8.4
WT-4	Cy5 (5.6)	PBS pH 7.4	Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse ün (PBS, pH·7.4) 0.6
WT-5	ATTO 647N (10) ATTO 488 (8.1)	PBS pH 7.4	Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse ün (PBS, pH·7.4) 1.4 9.8

Die Fluoreszenzscans ($\lambda = 633 \text{ nm}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$) der SDS-PAGE vor Coomassie-Färbung der der Ansätze WT-2–5 zeigten eine Markierung der Protease durch die Fluoreszenzfarbstoffe (vgl. **Abbildung 11.2** Anhang). Die von XXXXXXXXXX durchgeführten FCS-Messungen bestätigten unspezifische Markierungen durch die Fluoreszenzfarbstoffe.

Um auszuschließen, dass es sich bei den unspezifischen Wechselwirkungen um kovalente Bindungen des Maleimids an Aminosäuren wie Lysin oder Histidin handelte, wurde die Wildtyp-Protease mit Carbonsäure-Derivaten der Fluoreszenzfarbstoffe ATTO 647N und ATTO 488 umgesetzt. Zusätzlich wurde untersucht, ob der Zusatz von CHAPS als Tensid die hydrophoben Wechselwirkungen abschwächt oder verhindert. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 7.3.7 beschrieben und in **Tabelle 3.4** zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Markierungsbedingungen der Wildtypproteasen 6 & 7.

Ansatz mit	Markierungsbedingungen	Reinigungsbedingungen	DOL (%)
	Farbstoffe (molarer Überschuss)	Puffer	
WT-6	ATTO 647N (9.9) ATTO 488 (10)	Tris·HCl pH 7.0	Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse üN (Tris·HCl, pH·7.0)
WT-7	ATTO 647N (9.2) ATTO 488 (11)	Tris·HCl + CHAPS pH 7.0	Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse üN (Tris·HCl + CHAPS pH·7.0)

Der Ansatz WT-7 zeigt bezüglich des Farbstoffes ATTO 488 eine deutliche Markierungseffizienz. Die Untersuchungen von [REDACTED] ergaben bei Ansatz WT-6 eine deutliche Anwesenheit des Farbstoffes ATTO 488, welcher jedoch nur frei in der Lösung vorliegt und im Wesentlichen nicht an der DENV2-NS2B-NS3-Protease haftet. Grundsätzlich ergaben sich für die Ansätze WT-6 und WT-7 bezüglich ATTO 488 keine unspezifischen Adsorptionen an der Proteaseoberfläche.ⁱ Demnach ist sehr wahrscheinlich der Maleimid-Rest für eine kovalente Knüpfung der Fluoreszenzfarbstoffe mit Aminosäuren wie Lysin oder Histidin verantwortlich und es handelt sich nicht um unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen. Bei den Ansätzen WT-2–5 wurde bereits strikt ein pH von 7.0 bzw. 7.4 eingehalten, um unspezifische Markierungen zu verhindern, sodass nicht eindeutig geklärt werden kann, warum der Farbstoff anscheinend kovalente Bindungen eingeht. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass eine kovalente Bindung zu dem pH-unabhängigen Nucleophil Methionin entsteht, welches jedoch weniger reaktiv ist als Cystein und dadurch gegebenenfalls längere Reaktionszeiten benötigt.^[130] Der Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647N wurde ebenfalls in beiden Proben (WT-6 und WT-7) gefunden und es wurde näher untersucht, ob dieser frei in Lösung vorliegt oder am Protein unspezifisch haftet. Es stellte sich heraus, dass sowohl freier als auch unspezifisch gebundener Farbstoff vorhanden ist. Jedoch war der Anteil der an der Protease unspezifisch haftenden ATTO 647N-Moleküle im Vergleich zum Maleimid-Farbstoff reduziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von CHAPS die unspezifische Markierung

ⁱ Dies wurde anhand der lateralen Diffusion und den hydrodynamischen Radien der Moleküle ermittelt, wobei hier nicht näher darauf eingegangen wird.

durch ATTO 647N reduziert werden konnte. Teile der unspezifischen Bindungen können auf hydrophobe Wechselwirkungen (WW) zurückgeführt werden, da ATTO 647N nur mäßig hydrophil ist. **Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass der Maleimidrest mitverantwortlich ist für den größeren Anteil unspezifischer Markierungen, die auf kovalente Bindungen zurückgeführt werden können.** Aufgrund dieser Ergebnisse wurden erneut verschiedene Markierungsmethoden mit den Maleimid-Farbstoffen getestet, um auch mit diesen bessere Ergebnisse zu erzielen. Alternativ wurden Iodacetamid-Farbstoffe für die Umsetzung mit den Cysteinen in einer nucleophilen Substitution verwendet. **Tabelle 3.5** gibt eine Übersicht über die durchgeführten Experimente, wobei genauere Informationen zur Durchführung Abschnitt 7.3.7 entnommen werden können.

Tabelle 3.5: Markierungsbedingungen für die Proben 8–12 mit der Wildtyp-Protease. WT 8–11 wurden mit den Maleimid-Farbstoffen und WT-12 mit den Iodacetamid-Farbstoffen umgesetzt.

Ansätze mit	Markierungsbedingungen		Bedingungen	DOL (%)
	Farbstoffe (molarer Überschuss)	Puffer		
WT-8	ATTO 647N (5.6)	Tris·HCl + CHAPS + TCEP pH 6.8	Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse üN (Tris·HCl, CHAPS, pH·6.8)	0.4
	ATTO 488 (6.9)			0.0
WT-9	ATTO 647N (6.1)	Tris·HCl + TCEP pH 6.7	Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse üN (Tris·HCl, 300 mM NaCl, pH·6.8)	0.0
	ATTO 488 (5.0)			0.0
WT-10	ATTO 647N (9.2)	Tris·HCl pH 6.8	TCEP vor Markierung entfernt, Membranfiltration und Dialyse üN (Tris·HCl, pH·6.8)	23.8
	ATTO 488 (7.5)			12.7
WT-11 ¹	ATTO 647N (0.15)	Tris·HCl pH 6.8	Lyse mit pH 6.8, Markierung nach Ni ²⁺ -NTA-Säule, Membranfiltration und Dialyse üN (Tris·HCl, TCEP, pH·6.8)	1.5
	ATTO 488 (0.12)			1.4
WT-12	ATTO 647N (5.2)	Tris·HCl pH 8.0	+ TCEP, Membranfiltration bis Durchfluss klar und Dialyse üN (Tris·HCl, pH·8.0)	0.0
	ATTO 488 (5.4)			0.0

¹Geringer Farbstoffüberschuss, da immer annähernd gleiche Aliquots Farbstoff verwendet wurden, damit dieser für alle Ansätze ausreicht.

Gemäß der Markierungseffizienz (DOL) befindet sich nur in der Probe WT-10 eine signifikante Menge an Farbstoff. Alle anderen Proben zeigten nur einen sehr geringen bis keinen Farbstoffanteil. Bei WT-10 wurde ein erhöhter Farbstoffanteil ermittelt, jedoch konnte im Fluoreszenzscan kein Farbstoff detektiert werden (**Abbildung 11.3**, Anhang). Möglicherweise ist dies auf die eher geringe Proteinkonzentration von $2.1 \mu\text{M}$ zurückzuführen, da bei der Markierung nach Zugabe von TCEP etwas Protein ausgefallen ist (vgl. Abschnitt 7.3.7). [REDACTED] und [REDACTED] untersuchten die Proben WT-8-10 und 12 um zu evaluieren, welche Markierungsmethode für die Doppelmutanten geeignet ist. WT-11 wurde im Weiteren nicht näher betrachtet, da im Fluoreszenzscan die Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen an der Protease erkennbar war (vgl. **Abbildung 11.3** Anhang). Diese Proben wurden vor allem dahingehend untersucht, ob die nicht gänzlich vermeidbare, unspezifische Adsorption der Fluoreszenzfarbstoffe an der Protease grundsätzlich Einfluss auf potenzielle FRET-Untersuchungen hat. Bisher wurden Experimente mit nanomolaren Konzentrationen durchgeführt, was einer rund hundertfach höheren Konzentration entspricht, die in Einzelmolekülexperimenten verwendet wird. Dadurch sollte eventuell vorhandener Fluoreszenzfarbstoff in den WT-Protease-Proben sensitiv detektiert werden, um zu überprüfen, ob es sich um freie oder gebundene Farbstoffmoleküle handelt. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit den FCS-Burst-Experimenten der markierten DENV2-NS2V-NS3-Proteasen (S79C-G14C und S79C-S158C) wurden daraufhin die WT-Proteasen in pikomolaren Konzentrationen untersucht. Es stellte sich heraus, dass weder der Donor- noch der Akzeptor-Farbstoff in einem signifikanten Ausmaß an der WT-Protease adsorbieren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die geplanten FRET-Experimente nicht beeinflusst werden.

Anhand dieser Ergebnisse wurde als bestmögliche Markierungsstrategie eine Kombination aus den verschiedenen Versuchen zusammengestellt. Die Protease wird in einen Tris·HCl-Puffer pH 6.8 mit 1 mM CHAPS und 0.5 mM TCEP überführt und ca. 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird TCEP mit einem analogen Puffer (pH 6.8) ohne TCEP wieder entfernt und die Markierung mit einem 2–2.5-fachen molaren Farbstoffüberschuss für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reinigung erfolgt ebenfalls bei pH 6.8 mittels Membranfiltration, Dialyse und GPC (pH 8, ohne CHAPS). **Abbildung 3.5** gibt eine Übersicht über den molaren Überschuss

der Farbstoffe (hellgrün) im Vergleich zu den Markierungseffizienzen (ATTO 488 gelb, ATTO 647N dunkelblau, Cy5 türkisblau) sowohl an den WT-Proteasen, an den Einzelmutanten (vgl. Abschnitt 3.1.1.2) und an den Doppelmutanten (vgl. Abschnitt 3.1.1.4).

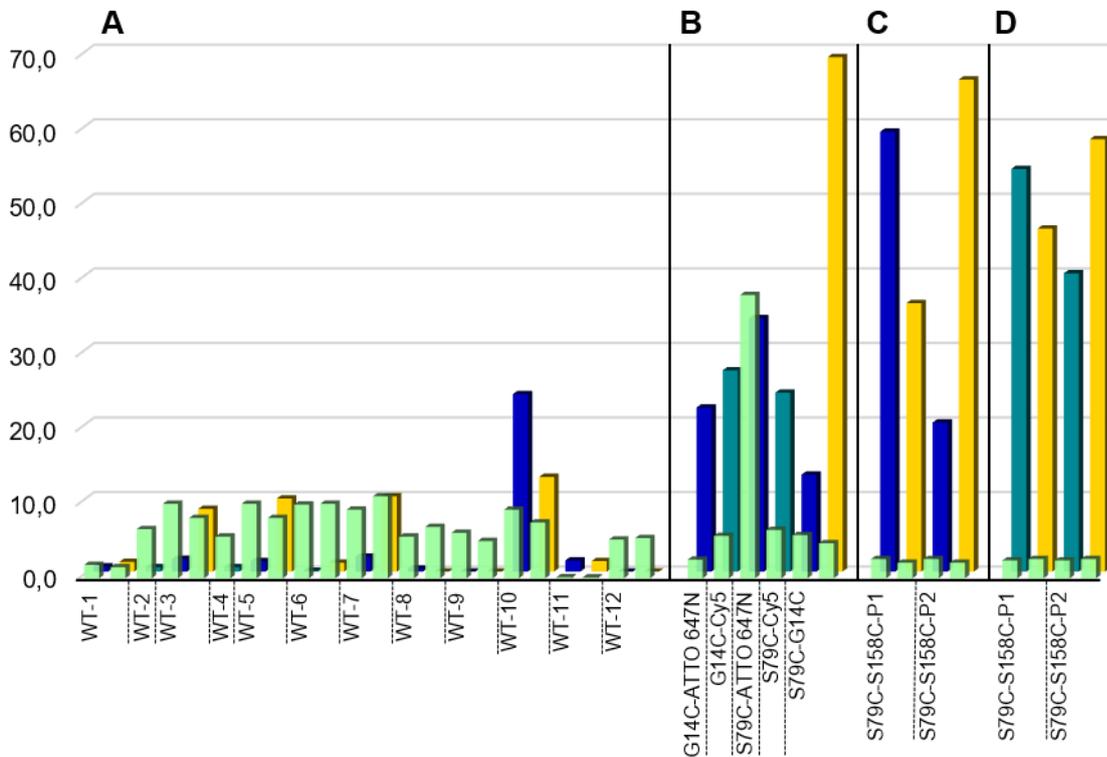


Abbildung 3.5: Übersicht der molaren Farbstoffüberschüsse (hellgrün) und Markierungseffizienzen (DOL in %, ATTO 488 (gelb), ATTO 647N (dunkelblau), Cy5 (türkisblau)) der DENV2-NS2B-NS3-Protease. **A)** Wildtyp-Proteasen, **B)** Einzelmutanten, **C)** Doppelmutante S79C-S158C (P1 und P2) mit ATTO 647N und ATTO 488, **D)** Doppelmutante S79C-S158C (P1 und P2) mit Cy5 und ATTO 488.

Im Bereich der DENV2-NS2B-NS3-Wildtyp-Proteasen (**Abbildung 3.5, A**) wird deutlich, dass auch sehr geringe Farbstoffmengen (z. B. WT-1 und WT-11) eine Markierung der Protease verursachen können. Hingegen wurde bei WT-8/9/12 nahezu kein Farbstoff detektiert, obwohl erhöhte Farbstoffkonzentration eingesetzt wurden. Dies zeigt, welchen Einfluss die jeweilige Markierungsmethode hat. Auffällig ist weiterhin eine wesentlich höhere Markierungseffizienz bei den Einzel- und Doppelmutanten der DENV2-NS2B-NS3-Protease, was gewünscht und zu erwarten ist. Bei der S79C-G14C Doppelmutante (vgl. Abschnitt 3.1.1.4) konnte mit einem etwas geringeren Überschuss ATTO 488 (4.7-fach im Vergleich zu 5.8-fach ATTO 647N) eine

wesentlich höhere DOL (69% im Vergleich zu 13%) erreicht werden (**Abbildung 3.5, B**). Für die DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C-Proteasen (vgl. Abschnitt 3.1.1.4) sind jeweils die Markierungseffizienzen beider Proteinfractionen (P1 und P2) aufgetragen (**Abbildung 3.5, C** (ATTO 647N und ATTO 488) und **D** (Cy5 und ATTO 488)). Durch eine Verdopplung der Farbstoffkonzentration auf einen ca. 5-fachen molaren Überschuss könnten möglicherweise erhöhte Markierungseffizienzen erreicht werden. Der Einfluss auf unspezifische Markierungen sollte sehr gering sein, da bei den Versuchen mit der Wildtyp-Protease ein 5–10-facher molarer Überschuss eingesetzt wurde, aber jedoch nur sehr wenige unspezifische Markierungen nach sich zog.

3.1.1.4 Doppelt markierte DENV2-NS2B-NS3-Proteasen

Damit der Energietransfer zwischen einem Donor- und Akzeptormolekül stattfinden kann, ist die Distanz zwischen den beiden Molekülen entscheidend (siehe Abschnitt 1.2.2.3). Anhand der verfügbaren 3D Strukturen der DENV2-NS2B-NS3-Protease konnte mit dem Programm PyMOL der theoretisch mögliche Abstand zwischen den Aminosäuren C79 (NS2B) und C14 (NS3) in der offenen (PDB: 2FOM^[44])^j und geschlossenen (PDB: 2M9P^[47]) Form bestimmt werden. Für die Herstellung einer Doppelmutante^k wurden die bereits vorhandenen Konstrukte „S79C“ (NS2B) und „G14C“ (NS3) verwendet. **Abbildung 3.6** veranschaulicht, wie sich der theoretische Abstand zwischen diesen beiden Aminosäuren durch den Wechsel der geschlossenen (**A**, 43.8 Å) in die offene (**B**, 25.6 Å) Konformation ändert. Der Energietransfer kann demnach nur in der offenen Konformation stattfinden.

^j In der offenen Struktur 2FOM sind die Aminosäuren S79 und G14 nicht aufgelöst und wurden mit dem Programm MOE2015.1001 modelliert. Für S79 wurden die fehlenden Aminosäuren durch Verlängerung der Kette hinzugefügt. Die Schleifenregion um G14 wurde basierend auf Homologie-Modellen konstruiert.

^k Hergestellt von [REDACTED] im Rahmen seiner Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von [REDACTED]
[REDACTED]^[132]

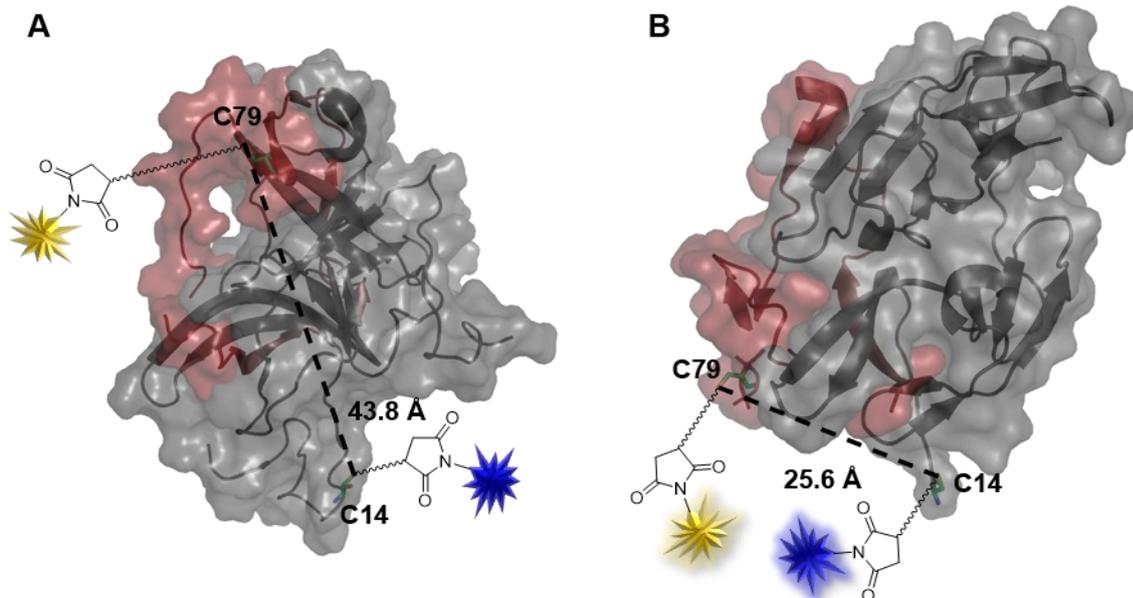


Abbildung 3.6: Änderung des theoretischen Abstands zwischen den Cysteinen C79 (NS2B) und C14 (NS3) in der geschlossenen (aktiv, 2M9P^[47], **A**) und offenen (inaktiv, 2FOM^[44], **B**) Konformation. NS3-Protease (grau), NS2B-Co-Faktor (rot), ATTO 647N-Maleimid (blau, schematisch), ATTO 488-Maleimid (gelb, schematisch). Die Grafik wurde mit PyMOL und Microsoft PowerPoint erstellt.

Die Markierung der Protease mit zwei verschiedenen Farbstoffen kann aufgrund der zwei identischen Aminosäuren nur statistisch erfolgen, da nicht vorausgesagt werden kann, in welchem Verhältnis diese stattfindet. Somit ergeben sich vier mögliche Varianten der markierten Protease: a) C79-ATTO 488/C14-ATTO 647N, b) C79-ATTO 647N/C14-ATTO 488, c) C79-ATTO 488/C14-ATTO 488, d) C79-ATTO 647N/C14-ATTO 647N. Dies hat grundsätzlich keinen Einfluss auf FRET-Untersuchungen im Einzelmolekülbereich, da hier nur Proteasen erfasst werden, bei denen ein Energietransfer stattfinden kann (Varianten a und b). Die Varianten c und d beeinflussen, wie die nicht-markierten Proteasen, lediglich die tatsächliche Proteinkonzentration. Die Markierung der Doppelmutante erfolgte zeitlich parallel zur Optimierung der Fluoreszenzmarkierung (siehe Abschnitt 3.1.1.3), sodass hier eine andere Markierungsmethode verwendet wurde. Dem Puffersystem wurde ebenfalls als Reduktionsmittel TCEP zur Reduktion möglicherweise ausgebildeter Disulfidbrücken zugesetzt, aber vor der Fluoreszenzmarkierung nicht entfernt. Das UV/Vis-Chromatogramm der NGC[™] (**Abbildung 3.7, A**) gibt keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines Dimers durch Disulfidbrücken. Dieses würde aufgrund der Größe vor dem Hauptproteinpeak eluiert werden. Die kleine Schulter vor

dem Hauptpeak ist typisch für die NS2B-NS3-Protease (unabhängig von Mutationen) und deutet auf ein Aggregat hin. Die UV/Vis-Spuren der beiden Farbstoffe stimmen mit der des Proteins überein und verdeutlichen eine erfolgreiche Markierung der Protease.

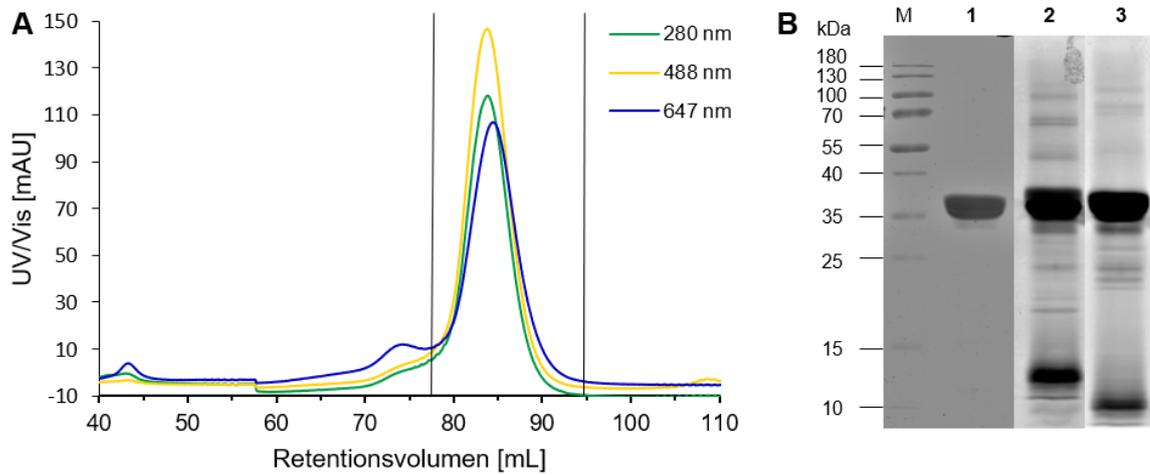


Abbildung 3.7: Fluoreszenzmarkierte DENV2-NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease (ATTO 488, ATTO 647N). **A)** UV/Vis-Chromatogramm der NGC™ (280 nm (grün, Protein), 488 nm (gelb, ATTO 488), 647 nm (blau, ATTO 647N)). **B)** SDS-PAGE **1:** nach Coomassie-Färbung, **2:** Fluoreszenzscan bei 633 nm, **3:** Fluoreszenzscan bei 532 nm.

Am Fluoreszenzdetektor wurden Fluoreszenzscans der SDS-PAGE vor der Färbung mit Coomassie durchgeführt (**Abbildung 3.7, B** Spur 1). Beide Scans zeigen deutliche Banden auf Höhe der Proteinbande der NS2B-NS3-Protease (**Abbildung 3.7, B** Spur **2** (633 nm, ATTO 647N) und Spur **3** (532 nm, ATTO 488)). Da es sich hierbei um eine sehr sensitive Methode handelt, sind ebenfalls Verunreinigungen durch kleinere und größere markierte Proteine bzw. Peptidfragmente zu erkennen. Diese haben jedoch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (vgl. Abschnitt 3.1.1.5) oder FRET-Messungen.

führte mit den in **Tabelle 3.6** zusammengefassten Liganden anschließend FCS-Burst Messungen an frei diffundierenden DENV-Proteasemolekülen durch, wobei die Daten auf Einzelmolekülebene betrachtet wurden.

Tabelle 3.6: Eingesetzte Konzentrationen der S79C-G14C-Protease und Liganden.

c S79C-G14C [pm]	c Ligand [µM]
82.4	-
41.2	31 (10)
41.2	32 (100)
41.2	33 (100)

Hierdurch können Aussagen darüber getroffen werden, ob die zwei Konformere vorliegen und sich gegebenenfalls in einem Gleichgewicht befinden und ob die Zugabe eines Inhibitors/Liganden eine der Konformationen stabilisieren kann. Dies kann direkt den erhaltenen 2D-Histogrammen entnommen werden.¹ Weiterhin wurden aus den Daten Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen berechnet. Durch diese zusätzlichen, auf Ensembleebene erhaltenen Informationen können qualitative und quantitative Aussagen über die strukturelle Dynamik der Protease getroffen werden. Ebenfalls können die Geschwindigkeitskonstanten des Konformationswechsels durch Anpassung der Korrelataionsfunktionen mit einem entsprechendem Modell bestimmt werden.^[133-135] Die aus den Intensitätszeitspuren berechneten Auto- und Kreuzkorrelationen der DENV2-NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease ($c \approx 82 \mu\text{M}$) geben keinen Hinweis auf Änderung der Konformationen in Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors **31**. Die Kreuzkorrelation (**Abbildung 3.8, A** schwarz) sollte im allgemeinen langsamer auf null abfallen als die beiden Autokorrelationen des Donor- und Akzeptorkanals, wenn ein Austausch zwischen den Konformationen mit unterschiedlicher Energietransfereffizienz stattfindet.^[134,135] Dies kann bei der S79C-G14C-Protease jedoch nicht beobachtet werden (**Abbildung 3.8, A**).

¹ Die Auswertung der von [REDACTED] durchgeführten Messungen wurde von [REDACTED] durchgeführt.

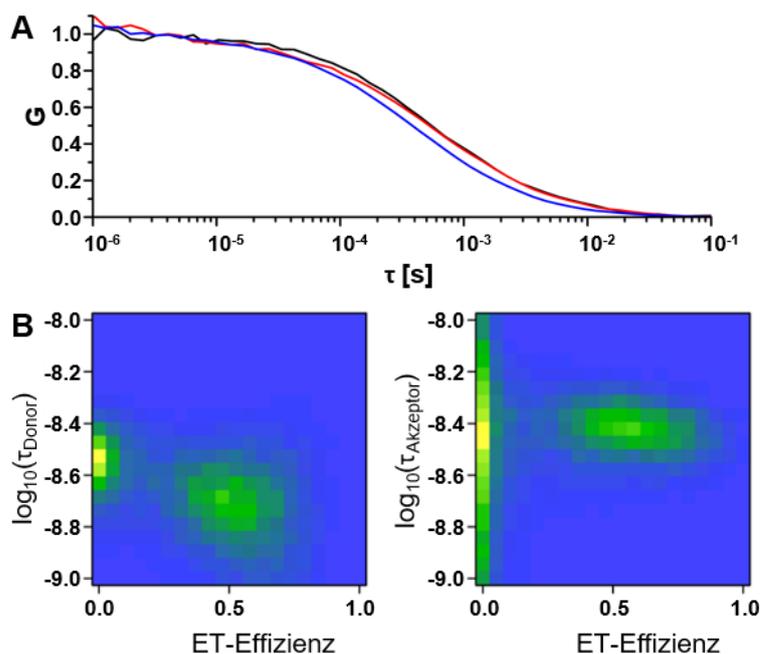


Abbildung 3.8: Fluoreszenzmarkierte DENV2-NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease (ATTO 488, ATTO 647N) vor Zugabe des kompetitiven Inhibitors **31**. **A)** Autokorrelation (Donor-Autokorrelation (blau), Akzeptor-Autokorrelation (rot)) und Kreuzkorrelation (schwarz), **B)** Aus der Burst-Analyse erhaltene 2D-Histogramme (Donorkanal (links), Akzeptorkanal (rechts)). Die Grafen wurden von [redacted] und [redacted] erstellt und zur Verfügung gestellt.

Die Burst-Analyse zeigt zudem keine zwei distinkten FRET-Populationen, sondern eine relativ symmetrische Punktwolke (**Abbildung 3.8, B**). Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass entweder kein Konformationsaustausch stattfindet oder dieser so schnell durchlaufen wird, dass nur eine Mittelung aus beiden Konformationen detektiert wird. Eine weitere mögliche Ursache könnte zudem in der hohen Flexibilität der Schleifen-Region (NS3-Pr), in der sich die Mutation G14C befindet, begründet sein. Dadurch können die Abstände der Punktmutationen bereits innerhalb einer Konformation stark variieren und ineinander übergehen. Dies führt zu einer breiten Verteilung der Abstände und überlagert somit den tatsächlichen Konformationswechsel. Anschließend wurde der Einfluss des kompetitiven Inhibitors **31**, sowie der Substrate **32** und **33** (vgl. **Tabelle 3.2**) untersucht. Die Zugabe von Verbindung **31** ($10.0 \mu\text{M}$ und 41.2 pM Protease) zeigt keine Veränderung in der Autokorrelationsfunktion und ebenfalls nur eine Punktwolke in dem aus der Burst-Analyse erhaltenen 2D-Histogramm, welche hin zu deutlich kleineren Energietransfer-Effizienzen verschoben ist (**Abbildung 3.9, A**).

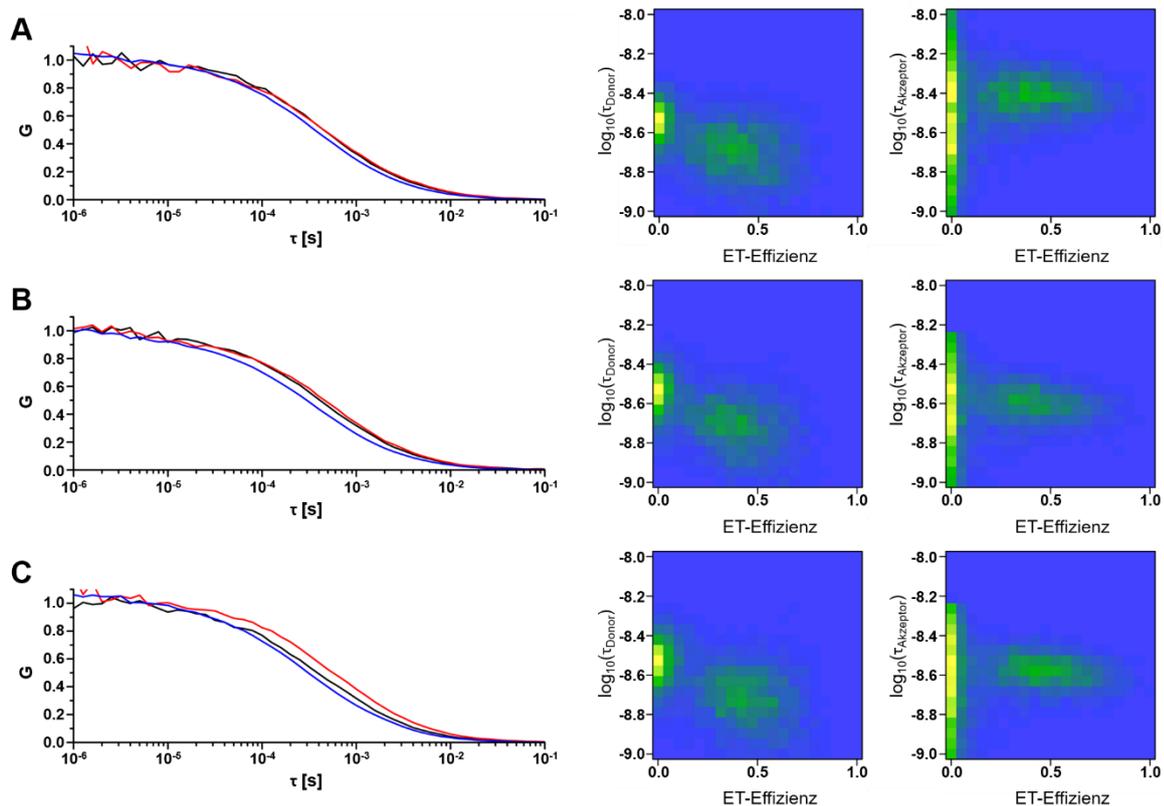


Abbildung 3.9: Fluoreszenzmarkierte DENV-NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease (ATTO 488, ATTO 647N) nach Zugabe der Verbindungen **31 (A)**, **32 (B)**, **33 (C)**; links Autokorrelation (Donor-Autokorrelation (blau), Akzeptor-Autokorrelation (rot)) und Kreuzkorrelation (schwarz); rechts aus der Burst-Analyse erhaltene 2D-Histogramme (Donorkanal (links), Akzeptorkanal (rechts)). Die Grafen wurden von [REDACTED] und [REDACTED] erstellt und zur Verfügung gestellt.

Kompetitive Inhibitoren stabilisieren bekanntermaßen die geschlossene Konformation der NS2B-NS3-Protease.^[46] Die Verschiebung der Punktvolken des 2D-Histogramms (**Abbildung 3.9**, rechts) zu kleineren ET-Effizienzen bestätigt diese Annahme. Im Falle der NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease wird der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren (C79, C14) in der geschlossenen Konformation größer und der Energieübertrag nimmt dadurch ab. Eine Aussage über ein dynamisches Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen kann anhand dieser Daten nicht getroffen werden. Für die Substrate **32** (100 μM und 41.2 μM Protease) und **33** (100 μM und 41.2 μM Protease) verhält es sich ähnlich (**Abbildung 3.9**, B und C, nicht gezeigt) sind die Daten vor der Zugabe der Substrate **32** und **33**). Die Kreuzkorrelationen fallen im Vergleich zur Akzeptor-Autokorrelation nach Zugabe der Substrate nur minimal schneller auf null, was ein erster Hinweis auf die Stabilisierung einer Konformation ist. Die FCS-Burst Analysen zeigen ebenfalls eine einzelne Punktvolke, wobei die Effekte

im Vergleich zur Zugabe des kompetitiven Inhibitor **31** geringer ausfallen. Daher wurden in diesen beiden Fällen Histogramme über die vorkommenden ET-Effizienzen der Gesamtpopulationen (beide Detektionskanäle) erstellt (**Abbildung 3.10**).

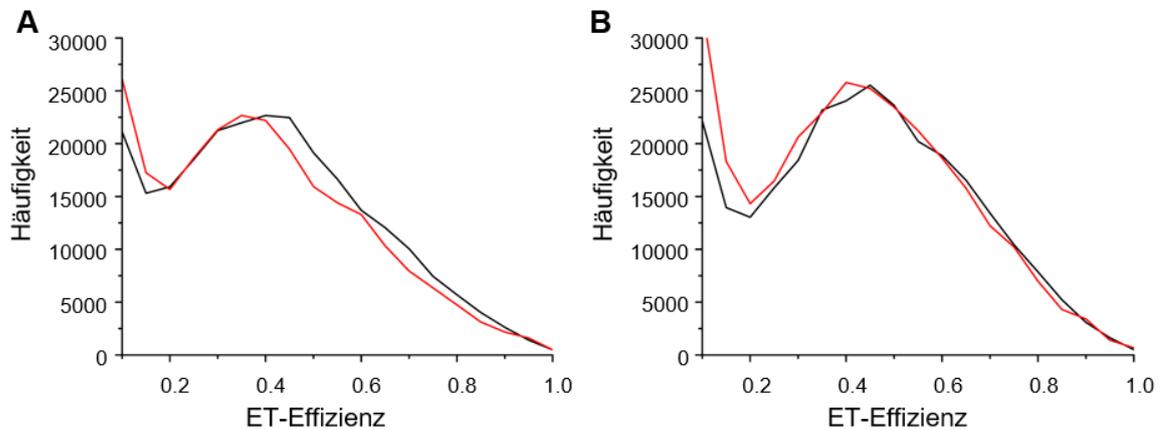


Abbildung 3.10: Fluoreszenzmarkierte DENV-NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease (ATTO 488, ATTO 647N). Histogramm über die Gesamtpopulation vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe der Substrate **32** (A) und **33** (B). Die Grafen wurden von [REDACTED] und [REDACTED] erstellt und zur Verfügung gestellt.

Die Histogramme (**Abbildung 3.10, A 32, B 33**) zeigen eine deutliche Verschiebung hin zu niedrigeren ET-Effizienzen und entsprechen somit den Erwartungen für die Doppelmutante NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease. Ursächlich für den geringer ausgeprägten Effekt bei den Substraten **32** und **33** im Vergleich zum kompetitiven Inhibitor **31** könnte die Spaltung der Substrate sein. Dadurch ist die Protease nicht wie durch die Bindung eines Inhibitors in der geschlossenen Konformation fixiert, sondern es kann zu Proteinbewegungen und somit zu Konformationsänderungen kommen.

Die Resultate zeigen, dass die Doppelmutante S79C-G14C der NS2B-NS3-Protease nicht besonders geeignet ist, um aussagekräftige Ergebnisse bezüglich der Konformationsänderungen und deren Kinetik zu erhalten. Daher wurde bei einem neuen Konstrukt die Mutation S79C im NS2B-Cofaktor beibehalten und in der NS3-Protease ebenfalls ein Serin 158 zu einem Cystein mutiert, welches sich in einem weniger flexiblen Bereich der Protease befindet (**Abbildung 3.11**). Im Gegensatz zur S79C-G14C-Mutante findet hier der effizientere Energietransfer in der geschlossenen, und somit aktiven Form, statt. Weiterhin ist der theoretische Abstand um jeweils ca. 6 Å größer (50.0 Å) bzw. kleiner (18.1 Å) im Vergleich zur S79C-G14C-Mutante (43.8 Å und 25.6 Å) und liefert dadurch vermutlich eindeutiger Ergebnisse.

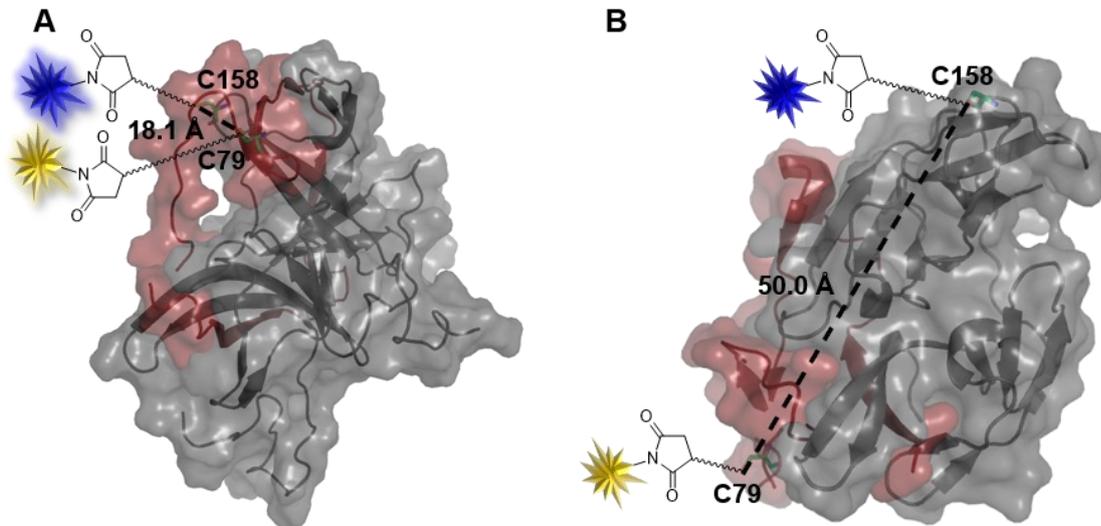


Abbildung 3.11: Änderung des theoretischen Abstandes zwischen den Cysteinen C79 (NS2B) und C158 (NS3) in der geschlossenen (aktiv, 2M9P^[47], **A**) und offenen (inaktiv, 2FOM^[44], **B**) Konformation. NS3-Protease (grau), NS2B-Co-Faktor (rot), ATTO 647N (blau, schematisch), ATTO 488 (gelb, schematisch).

Die Markierung erfolgte nach den optimierten Bedingungen (vgl. Abschnitt **Fehler! V erweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) unter Zusatz von TCEP und CHAPS im Markierungs-Puffer. Interessanterweise zeigte sich in diesem Fall ein ungewöhnliches UV/Vis-Chromatogramm der NGC™, in dem zwei deutliche Peaks zu erkennen sind (**Abbildung 3.12, A**). Die Konzentrationsbestimmung an einem UV-VIS Spektrophotometer ergab $13.6 \mu\text{M}$ für Peak 1 und $11.7 \mu\text{M}$ für Peak 2. In beiden Peaks befindet sich die NS2B-NS3-Protease, wie anhand der SDS-PAGE nach den Fluoreszenzscans ($\lambda = 633 \text{ nm}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$) sowie nach Coomassie-Färbung zu erkennen ist (**Abbildung 3.12, B-D**, Spur 7–11). Die Fluoreszenzscans der SDS-PAGE zeigen zudem, dass nach der Markierung vor allem in Peak 1 (**Abbildung 3.12, C 633 nm und D 532 nm**, Spur 7–10) eine zweite Bande mit höheren Molekulargewicht ($\sim 70 \text{ kDa}$) erscheint. Hierbei handelt es vermutlich um ein Dimer, welches durch Ausbildung von Disulfidbrücken entstanden ist. Da das Reduktionsmittel TCEP vor der Markierung entfernt wurde, können die freien Thiolgruppen der Cysteine nicht nur mit den Maleimiden der Fluoreszenzfarbstoffe reagieren, sondern auch Disulfidbrücken ausbilden. Durch das erhöhte Molekulargewicht des Disulfids erfolgt eine Auftrennung mittels GPC, welche zwei Peaks im UV-Chromatogramm der NGC™ verursacht (**Abbildung 3.12, A**).

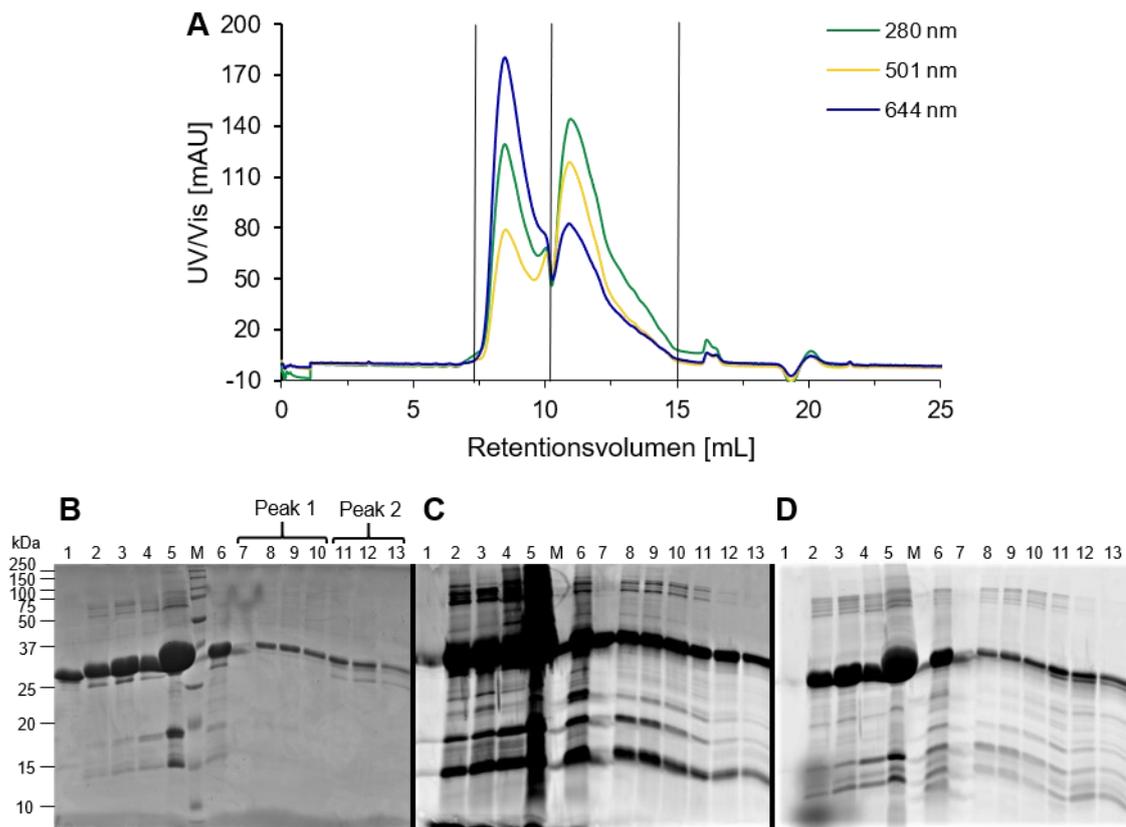


Abbildung 3.12: Fluoreszenzmarkierte DENV-NS2B-NS3-S79C-S158C-Protease (ATTO 488, ATTO 647N). **A)** UV/Vis-Chromatogramm der NGC™ (280 nm (grün, Protein), 501 nm (gelb, ATTO 488), 644 nm (blau, ATTO 647N)). **B)** SDS-PAGE (Coomassie); 1 = vor Markierung, 2 = nach Markierung, 3 = nach Membranfiltration, 4 = nach Dialyse, 5 = ausgefallenes Protein, M = Marker, 6 = Beladung GPC, 7 = Fraktion A8, 8 = Fraktion A9, 9 = Fraktion A10, 10 = Fraktion A11, 11 = Fraktion A12, 12 = Fraktion A13, 13 = Fraktion A14. **C)** Fluoreszenzscan bei 633 nm der SDS-PAGE vor Färbung mit Coomassie. **D)** Fluoreszenzscan bei 532 nm der SDS-PAGE vor Färbung mit Coomassie.

Der Anteil des Disulfids ist im Verhältnis zur Protease geringer und erst durch den sensitiven Fluoreszenzscan sichtbar geworden (**Abbildung 3.12, C 633 nm und D 532 nm**). Um sicherzustellen, dass die Protease weiterhin aktiv ist, wurden beide Peaks in einem fluorimetrischen Assay bezüglich der Protease-Aktivität wie in Abschnitt 3.1.1.5 beschrieben untersucht. Weiterhin sind anscheinend in beiden Proteinfractionen (**Abbildung 3.12, A**) unterschiedliche Anteile der eingesetzten Farbstoffe ATTO 488 (501 nm) und ATTO 647N (644 nm) enthalten. So zeigt Peak 1 eine höhere Absorption von ATTO 647N und Peak 2 von ATTO 488. Dieser Trend spiegelt sich in den berechneten Markierungseffizienzen (DOL) beider Proteinfractionen wider. In Peak 1 ist das Verhältnis ATTO 488/ATTO 647N 59:36 und in Peak 2 20:66. Die

Fluoreszenzscans (**Abbildung 3.12, C 633 nm, D 532 nm**) zeigen ebenfalls eine erfolgreiche Markierung der Protease.

Für die von [REDACTED] durchgeführten Experimente wurden die in **Tabelle 3.7** zusammengefassten Liganden und Proteinkonzentrationen verwendet.

Tabelle 3.7: Eingesetzte Konzentrationen der S79C-S158C-Protease und der Liganden.

c S79C-S158C [pM]	c Ligand [μ M]
102.6	-
51.3	31 (10)
77.0	30 (25)
51.3	30 (50)
51.3	32 (100)
51.3	33 (100)

Ohne Zugabe eines Liganden zeigt die Kreuzkorrelation einen deutlich langsameren Abfall auf null als die beiden Autokorrelationen. In den aus der FCS-Burst-Analyse erhaltenen 2D-Histogrammen ist im Vergleich zur S79C-G14C-Mutante eine Veränderung in der Punktwolke (gestreckt entlang der X-Achse, **Abbildung 3.13** oben) zu erkennen.

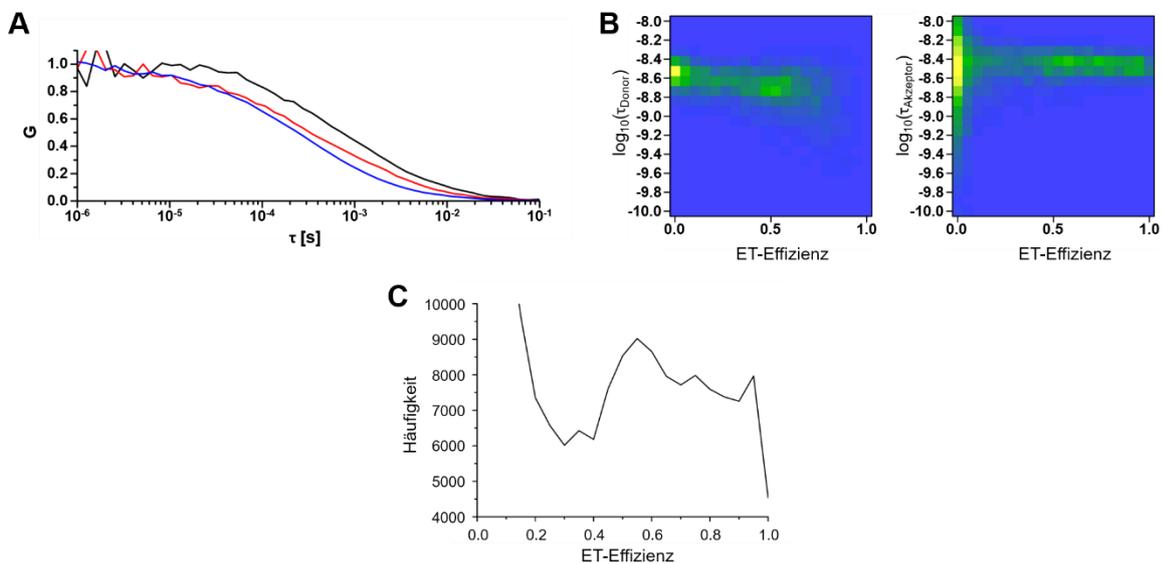


Abbildung 3.13: Fluoreszenzmarkierte NS2B-NS3-S79C-S158C-Protease (ATTO 488, ATTO 647N) vor Zugabe des kompetitiven Inhibitors **31**, **A**) Autokorrelation (Donor-Autokorrelation (blau), Akzeptor-Autokorrelation (rot)) und Kreuzkorrelation (schwarz), **B**) Aus der Burst-Analyse erhaltene 2D-Histogramme (Donorkanal (links), Akzeptorkanal (rechts)), **C**) Histogramm über die Gesamtpopulation. Die Grafen wurden von [REDACTED] und [REDACTED] erstellt und zur Verfügung gestellt.

Die Gesamtpopulation an vorkommenden Energietransfereffizienzen zeigt zudem ein Vorhandensein von mindestens zwei Maxima und somit zwei FRET-Populationen (**Abbildung 3.13** unten). Eines der Maxima befindet sich bei ca. 55% und ein weiteres bei über 90% der Energietransfereffizienz. Letzteres ist etwas schwächer ausgebildet. Die Daten korrelieren gut mit den theoretisch erwarteten Werten für die Energietransfereffizienz (offener Zustand 47%, geschlossener Zustand 99%). Aus den 2D-Histogrammen kann in Kombination mit den Korrelationsfunktionen geschlussfolgert werden, dass ein Austausch zwischen beiden Konformationen in Abwesenheit eines Liganden stattfindet. Durch die Zugabe des kompetitiven Inhibitors **31** kommt es zu einer Veränderung der Autokorrelation. Die Kreuzkorrelation (**Abbildung 3.14**, schwarz) fällt nicht mehr langsamer auf null ab als die Akzeptor-Autokorrelation (rot). Dementsprechend ist kein Konformationsaustausch mehr möglich, da eine Konformation (geschlossen) stabilisiert wird (**Abbildung 3.14**, A).

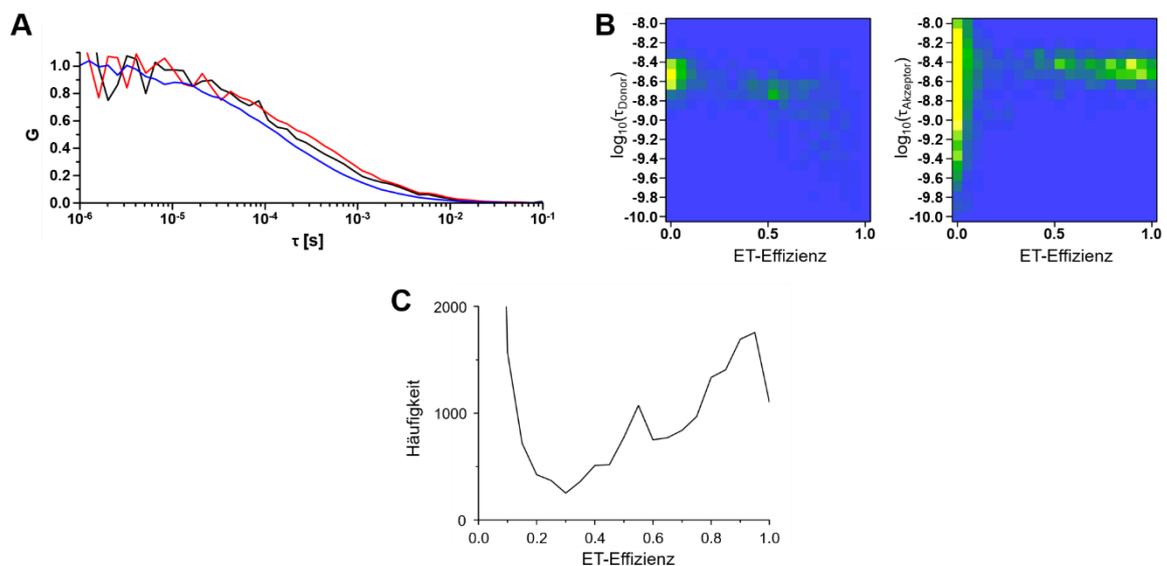


Abbildung 3.14: Fluoreszenzmarkierte NS2B-NS3-S79C-S158C-Protease (ATTO 488, ATTO 647N) nach Zugabe des kompetitiven Inhibitors **31**, **A**) Autokorrelation (Donor-Autokorrelation (blau), Akzeptor-Autokorrelation (rot)) und Kreuzkorrelation (schwarz), **B**) Aus der Burst-Analyse erhaltene 2D-Histogramme (Donorkanal (links), Akzeptorkanal (rechts)), **C**) Histogramm über die Gesamtpopulation. Die Grafen wurden von [REDACTED] und [REDACTED] erstellt und zur Verfügung gestellt.

Die FCS-Burst-Analyse sowie die Auswertung der Gesamtpopulation über beide Kanäle (Donor und Akzeptor) bestätigen eine Verschiebung der FRET-Population zu großen

Energietransfereffizienzen (**Abbildung 3.14, B und C**). Deutlich zugenommen hat dabei die Subpopulation mit über 90% ET-Effizienzen, was wiederum der geschlossenen Konformation zugeordnet werden kann. Es konnte mit beiden Doppelmutanten gezeigt werden, dass durch Verbindung **31** wie erwartet die geschlossene Konformation stabilisiert wird. Im Gegensatz dazu wird davon ausgegangen, dass der nicht-kompetitive Inhibitor **30** nach bisherigem Kenntnisstand den offenen Zustand begünstigt bzw. in die offene Konformation bindet. Die FCS-Burst Experimente ergaben allerdings ein fehlendes Signal im Akzeptorkanal nach Anregung bei einer Wellenlänge von 502 nm. Jedoch sollte selbst im offenen Zustand aufgrund der theoretischen Größe der Protease (~ 5 nm) eine ET-Effizienz von ungefähr 47% vorliegen. Weitere Untersuchungen legen den Verdacht nahe, dass die Fluoreszenz des Farbstoffes ATTO 647N vermutlich durch π - π -Wechselwirkungen mit dem nicht-kompetitiven Inhibitor **30** gelöscht wird. Diese Ergebnisse führten zu der Entscheidung die S79C-S158C-Doppelmutante erneut mit dem hydrophileren Akzeptorfarbstoff Cy5 zu markieren. Für beide Substrate **32** und **33** wurden die angenommenen Verschiebungen zu höheren ET-Effizienzen ebenfalls beobachtet, was die Stabilisierung des geschlossenen Zustandes verdeutlicht (Daten nicht gezeigt). Die Zunahme der Effizienzen liegt jeweils über 70% und somit etwas unter der des kompetitiven Inhibitors **31**. Dies könnte wie bereits erwähnt darin begründet sein, dass der Inhibitor die Protease länger und stabiler in der geschlossenen Konformation hält und die Substrate, welche durch die Protease umgesetzt werden, zu einer kontinuierlichen Bewegung der Protease führen. **Zusammengefasst bestätigen die bisherigen Ergebnisse an beiden Doppelmutanten, dass sowohl der kompetitive Inhibitor 31 als auch die Substrate 32 und 33 den geschlossenen Zustand der DENV2-NS2B-NS3-Protease begünstigen bzw. stabilisieren.** Für den nicht-kompetitiven Inhibitor **30** konnten hingegen noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden, weshalb die S79C-S158C-Protease erneut mit den Fluoreszenzfarbstoffen ATTO 488 als Donor und Cy5 als Akzeptor (anstelle von ATTO 647N) markiert wurde. Diese erfolgte unter analogen Bedingungen (vgl. Abschnitt 7.3.6). Nach säulenchromatographischer Reinigung wurden ebenfalls zwei Fraktionen isoliert, in denen Protease enthalten war (vgl. **Abbildung 3.15**).

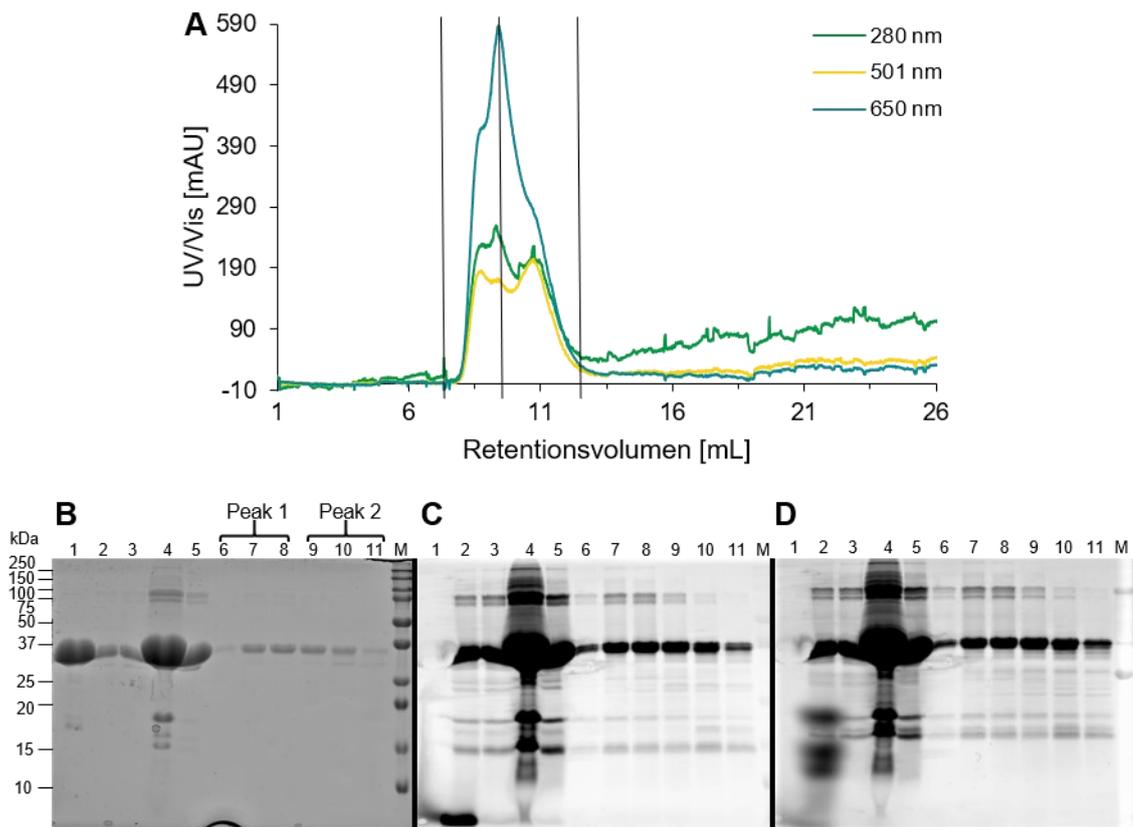


Abbildung 3.15: Fluoreszenzmarkierte DENV-NS2B-NS3_S79C-S158C-Protease (ATTO 488, Cy5). **A)** UV/Vis-Chromatogramm der NGC™ (280 nm (grün, Protein), 501 nm (gelb, ATTO 488), 650 nm (blau, Cy5)). **B)** SDS-PAGE (Coomassie); 1°=°vor Markierung, 2 = nach Markierung, 3 = nach Dialyse, 4 = ausgefallene Protease, 5 = Beladung GPC, 6 = Fraktion A10, 7 = Fraktion A11, 8 = Fraktion A12, 9 = Fraktion A13, 10 = Fraktion A14, 11 = Fraktion 15, M = Marker. **C)** Fluoreszenzscan bei 633 nm der SDS-PAGE vor Färbung mit Coomassie. **D)** Fluoreszenzscan bei 532 nm der SDS-PAGE vor Färbung mit Coomassie.

Die von [REDACTED] durchgeführten Experimente wurden analog zu denen mit der ATTO 488/ATTO 647N markierten Protease mit den nachstehenden Konzentrationen durchgeführt.

Tabelle 3.8: Eingesetzte Konzentrationen der S79C-S158C-Protease und Liganden.

c S79C-S158C [pm]	c Ligand [µM]
128.7	-
64.4	31 (10)
64.4	30 (50)
64.4	32 (100)
64.4	33 (100)

Für die Substrate **32** und **33**, sowie für den kompetitiven Inhibitor **31** konnten die vorherigen Ergebnisse reproduziert werden und es wurde jeweils eine Stabilisierung

der geschlossenen Konformation verifiziert (Daten nicht gezeigt). Für den nicht-kompetitiven Inhibitor **30** wurde zunächst überprüft, ob dieser ebenfalls die Fluoreszenz des Akzeptors Cy5 beeinflusst, beziehungsweise löscht. Auch hier konnte eine Abnahme der Bursts im Akzeptorkanal festgestellt werden, welche jedoch im Vergleich zur ATTO 647N markierten Protease geringer ausfiel. Die Kreuzkorrelation nach Zugabe des Inhibitors fällt schneller auf null als ohne Inhibitor, was darauf hinweist, dass kein Konformationswechsel möglich ist und ein Zustand begünstigt vorliegt (**Abbildung 3.16**, links **A**) ohne **30** und **B**) mit **30**). Da in diesem Falle eine Verschiebung der ET-Effizienzen zu niedrigeren Werten erwartet wird, sollte sich die Punktwolke im 2D-Histogramm entsprechend nach links verschieben (**Abbildung 3.16**, rechts **A**) ohne **30** und **B**) mit **30**).

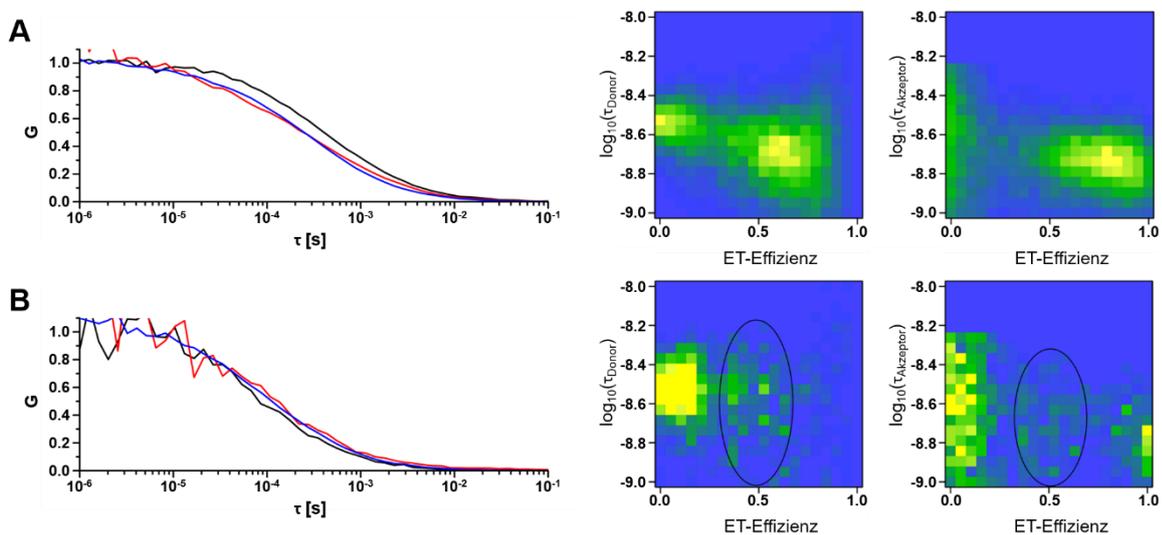


Abbildung 3.16: DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C-Protease (ATTO 488, Cy5) vor (**A**) und nach (**B**) Zugabe des nicht-kompetitiven Inhibitors **30**. Links: Autokorrelation (Donor-Autokorrelation (blau), Akzeptor-Autokorrelation (rot)) und Kreuzkorrelation (schwarz). Rechts: Aus der Burst-Analyse erhaltene 2D-Histogramme (Donorkanal (links), Akzeptorkanal (rechts)). Die Grafen wurden von [redacted] und [redacted] erstellt und zur Verfügung gestellt.

Die in einer ersten Messreihe erhaltenen Daten sind nicht eindeutig auswertbar, geben jedoch einen Hinweis darauf, dass sich die Punktwolke tendenziell zu kleineren ET-Effizienzen (40–60%) verschiebt. Erwartet wird für die offene Konformation eine ET-Effizienz von rund 53%, sodass zunächst davon ausgegangen werden kann, dass der nicht-kompetitive Inhibitor **30** den offenen Zustand stabilisiert. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, steht eine Wiederholung und Optimierung der Experimente aus.

3.1.1.5 Enzymkinetik der markierten DENV2-NS2B-NS3-Proteasen

Welchen Einfluss die Fluoreszenzmarkierung auf die Aktivität der Protease hat, wurde in einer fluorimetrischen Messung untersucht (vgl. Abschnitt 0). Einerseits wurden die Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) und weitere kinetische Parameter (v_{max} , k_{cat}) der markierten Proteasen bestimmt, und andererseits getestet, ob sich diese durch kompetitive oder nicht-kompetitive Inhibitoren hemmen lassen. Für die experimentelle Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante wurde der Substratumsatz pro Zeit bei steigender Substratkonzentration anhand der Änderungen des Fluoreszenzsignales ermittelt. Die Messung der K_M -Werte wurde wie in Abschnitt 8.1 beschrieben mit dem Fluoreszenzsubstrat Boc-GRR-AMC durchgeführt. Li *et al.* ermittelten für die DENV2 Wildtyp-Protease mit diesem Substrat einen K_M -Wert von $150 \pm 15 \mu\text{M}$ ($k_{cat} = 0.13 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_M = 840 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[40] Die für die untersuchten DENV2-NS2B-NS3 Mutanten und fluoreszenzmarkieren Mutanten ermittelten Werte sind in **Tabelle 3.9** zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Mittels fluorimetrischen Assays (Boc-GRR-AMC) experimentell bestimmte kinetische Parameter der DENV2-NS2B-NS3-Proteasen mit und ohne Markierung. EK steht für Enzymkonzentration.

DENV2-NS2B-NS3-Protease	EK [nM]	K_M [μM]	v_{max} [RFU/s]	v_{max} [$\mu\text{M}/\text{s}$]	k_{cat} [1/s]	k_{cat}/K_M [1/(M·s)]
WT ¹	250	594.9 ± 19.3	26.5 ± 1.1	7.8·10 ⁻³ ± 3.1·10 ⁻⁴	3.1·10 ⁻² ± 1.2·10 ⁻³	52.0 ± 2.7
G14C + His ₆ -Tag	125.0	673.3 ± 145.0	2.9 ± 0.4	8.5·10 ⁻⁴ ± 1.1·10 ⁻⁴	6.8·10 ⁻³ ± 8.7·10 ⁻⁴	10.1 ± 2.5
G14C-ATTO 647N + His ₆ -Tag	115.0	929.9 ± 165.4	0.8 ± 0.1	2.3·10 ⁻⁴ ± 2.8·10 ⁻⁵	2.1·10 ⁻³ ± 2.4·10 ⁻⁴	2.3 ± 0.5
G14C-ATTO 647N - His ₆ -Tag	60.0	183.1 ± 37.9	0.4 ± 0.03	1.1·10 ⁻⁴ ± 8.2·10 ⁻⁶	1.8·10 ⁻³ ± 1.4·10 ⁻⁴	9.8 ± 2.2
G14C-Cy5 + His ₆ -Tag	180.0	663.0 ± 77.7	1.4 ± 0.1	44.0·10 ⁻⁴ ± 2.7·10 ⁻⁵	2.2·10 ⁻³ ± 1.5·10 ⁻⁴	3.3 ± 0.5
S79C	125.0	1296.7 ± 104.5	19.4 ± 1.0	5.7·10 ⁻³ ± 3.0·10 ⁻⁴	4.5·10 ⁻² ± 2.4·10 ⁻³	35.0 ± 3.4
S79C-ATTO 647N	125.0	673.2 ± 52.2	3.0 ± 0.1	8.6·10 ⁻⁴ ± 3.5·10 ⁻⁵	6.9·10 ⁻³ ± 2.8·10 ⁻⁴	10.4 ± 0.9
S79C-Cy5	96.0	557.3 ± 51.3	2.8 ± 0.1	8.0·10 ⁻⁴ ± 3.7·10 ⁻⁵	8.4·10 ⁻³ ± 3.8·10 ⁻⁴	15.0 ± 1.5
S79C-G14C	125.0	764.7 ± 80.82	4.6 ± 0.3	1.4·10 ⁻³ ± 7.9·10 ⁻⁵	1.1·10 ⁻² ± 6.3·10 ⁻⁴	14.1 ± 1.7
S79C-G14C-ATTO 488/647N	125.0	610.6 ± 82.2	3.3 ± 0.3	9.6·10 ⁻⁴ ± 7.3·10 ⁻⁵	7.7·10 ⁻³ ± 5.8·10 ⁻⁴	12.6 ± 2.0
S79C-S158C	125.0	1476.1 ± 125.0	3.8 ± 0.2	1.1·10 ⁻³ ± 6.4·10 ⁻⁵	9.0·10 ⁻³ ± 5.1·10 ⁻⁴	6.1 ± 0.6
S79C-S158C-ATTO 488/647N	125.0	804.2 ± 53.5	1.5 ± 0.1	4.4·10 ⁻⁴ ± 1.8·10 ⁻⁵	3.5·10 ⁻³ ± 1.5·10 ⁻⁴	4.4 ± 0.3
S79C-S158C-ATTO 488/Cy5 (P2)	125.0	776.9 ± 53.7	1.3 ± 0.1	3.8·10 ⁻⁴ ± 1.5·10 ⁻⁵	3.1·10 ⁻³ ± 1.2·10 ⁻⁴	3.9 ± 0.3

¹Die Parameter der Wildtyp-Protease wurden von [redacted] experimentell bestimmt.^[132]

Es wird deutlich, dass es keinen klaren Trend bei den Michaelis-Menten-Konstanten gibt. Beispielsweise hat die DENV2-NS2B-NS3-S79C-Mutante einen ca. doppelt so hohen K_M -Wert wie die WT-Protease (1296.7 μM /594.9 μM). Die markierten S79C-Mutanten bewegen sich hingegen im gleichen Größenbereich wie die WT-Protease (S79C-ATTO 647N = 673.2 μM , S79C-Cy5 = 557.3 μM). Grundsätzlich weichen die K_M -Werte der markierten Mutanten jedoch nicht stark von der Wildtyp-Protease ab. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Affinität der

Protease zum Substrat durch die Farbstoffe nicht wesentlich beeinflusst wird. Die katalytische Effizienz einer einzelnen Protease (k_{cat}/K_M) verringert sich durch Einführung einer Mutation im Vergleich zur Wildtyp-Protease (z.B. S79C-S158C = $6.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, WT = $52.0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Durch die Farbstoffmarkierung wird diese jedoch nicht weiter beeinflusst. Anhand dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass sowohl die Mutanten als auch die markierten Mutanten funktionsfähig sind und für die angestrebten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen eingesetzt werden können (vgl. Abschnitt 3.1.1.4).

Des Weiteren wurden die für die FRET-Messungen relevanten Inhibitoren an den fluoreszenzmarkierten Proteasen getestet (**Tabelle 3.10**). Hierfür wurden die Inhibitoren wie unter 8.2 beschrieben mit Konzentrationen von $20 \mu\text{M}$ in einer Doppelbestimmung eingesetzt und die prozentuale Hemmung der Protease-Aktivität ermittelt. Zunächst wurde die anfängliche Leitstruktur **8** ($\text{IC}_{50} = 4.20 \pm 0.44 \mu\text{M}$ ^[66]) untersucht. Diese zeigte immer eine Inhibition der Proteasen von über 80%, was für dieses Molekül erwartet wird. Wie bereits erläutert, ist diese Struktur hinsichtlich der Fluoreszenzeigenschaften nicht kompatibel mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647N. Grundsätzlich erwiesen sich die Eigenschaften (z. B. Lipophilie) von Verbindung **8** als nicht optimal, weshalb unter anderem in der Doktorarbeit von [REDACTED] an der Optimierung der Struktur gearbeitet wurde.^[136] Die daraus resultierende Verbindung **30** wurde als neuer nicht-kompetitiver Inhibitor eingesetzt. Neben der Bestimmung der inhibitorischen Wirkung auf die fluoreszenzmarkierten Proteasen (**Tabelle 3.10**) wurde dieser ebenfalls für FRET- und EPR^m-spektroskopischen Messungen verwendet.

^m EPR steht für *electron paramagnetic resonance* Spektroskopie und wurde im Rahmen der Masterarbeit von [REDACTED] an verschiedenen Cys-Mutanten der DENV2-NS2B-NS3-Protease durchgeführt.^[132]

Tabelle 3.10: Inhibition der markierten DENV2-NS2B-NS3-Proteasen durch kompetitive (**31**) und nicht-kompetitive (**8, 30, 34**) Inhibitoren.

DENV2-NS2B-NS3-Protease	Inhibitor	% Inhibition bei 20 μM
G14C	8	80
G14C-ATTO 647N mit His ₆ -Tag ¹	8	95
G14C-Cy5	8	84
S79C	8	81
S79C-Cy5	34 ²	59
S79C-G14C	31	92
S79C-G14C-ATTO 488/647N	31	95
	30 ²	77
S79C-S158C	30	40
S79C-S158C-ATTO 488/647N (P1)	8	95
S79C-S158C-ATTO 488/647N (P2)	8	96
S79C-S158C-ATTO 488/Cy5 (P1)	31	100
S79C-S158C-ATTO 488/Cy5 (P2)	31	100

¹Da eine sehr geringe Enzymkonzentration (25 nM, bei 5 μL) vorlag, wurden 10 μL Enzym (50 nM) und nur 5 μL **8** (10 μM) verwendet. ²Neue Strukturen aus der Reihe der Prolin-Derivate, auf die die spätere Synthese potenzieller markierten Inhibitoren basiert (vgl. Abschnitt 3.1.2.5). **30** $\text{IC}_{50} = 19.7 \pm 1.50$, **34** $\text{IC}_{50} = 10.0 \pm 0.99$.^[45]

Um herauszufinden, ob nicht-kompetitive Inhibitoren eine andere Konformation stabilisieren als kompetitive Inhibitoren, wurde zusätzlich der kompetitive Inhibitor **31**ⁿ für die verschiedenen Messungen (z. B. FCS-Burst) verwendet. Zunächst wurde der IC_{50} -Wert an der Wildtyp-Protease mit dem in der Veröffentlichung von BEHNAM *et al.* beschriebenen Wert verglichen.^[123] Der ermittelte IC_{50} -Wert an der Wildtyp-Protease liegt nur minimal höher als der in der Literatur angegebene.^[123] Als Ursache können Unterschiede in der Durchführung der fluorimetrischen Enzymassays angenommen werden, u. a. die Inkubationszeit der Protease mit dem Inhibitor, unterschiedliche Substrate und Pufferzusammensetzungen sowie die Verwendung verschiedener Geräte zur Messung der Fluoreszenzeinheiten (vgl. Abschnitt 8 mit der von der Literatur^[123] angegebenen Quelle^[137]). Die mit ATTO 488 und ATTO 647N markierte Doppelmutante S79C-S158C wies einen annähernd gleichen IC_{50} -Wert auf wie die Wildtyp-Protease (**Tabelle 3.11**).

ⁿ Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. [REDACTED] der Universität Heidelberg.

Tabelle 3.11: IC₅₀-Werte des kompetitiven Inhibitors **31** an der Wildtyp-Protease und der markierten S79C-S158C-Protease.

NS2B-NS3-Protease	31 IC ₅₀ [μ M]
Wild-Typ	0.6 ($K_i = 0.4 \mu$ M) ^[123]
Wild-Typ	1.68 \pm 0.13
S79C-G14C-ATTO 488-ATTO 647N	1.59 \pm 0.22

Für die markierte Doppelmutante NS2B-NS3-S79C-S158C wurde wie oben erwähnt ein neuartiges Trennverhalten bei der Größenausschlusschromatographie verzeichnet. Durch den kompetitiven Inhibitor **31** konnten beide Proteinfractionen (P1 und P2, markiert mit ATTO488 und Cy5) nahezu vollständig in ihrer Aktivität gehemmt werden (**Abbildung 3.17**).

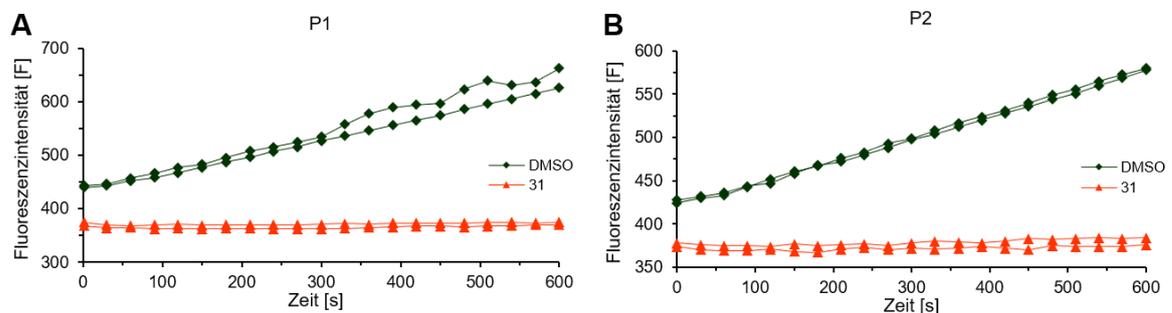


Abbildung 3.17: DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C (ATTO 488, Cy5). **A)** P1 (Peak1, NGC™-UV/Vis-Chromatogramm); Enzymaktivität gehemmt durch kompetitiven Inhibitor **31** (orange). **B)** Analog A mit Peak2 des NGC™-UV/Vis-Chromatogramms (siehe **Abbildung 3.15**).

Im Rahmen der Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten der markierten Proteasen wurde weiterhin untersucht, welchen Einfluss die Pufferzusammensetzung auf deren Aktivität hat. Der lipophile Co-Faktor NS2B der DENV2-NS2B-NS3-Protease ist *in vivo* mit der Membran assoziiert. Durch den Zusatz von Glycerol im Assay-Puffer werden die lipophilen Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem Lösemittelsystem reguliert.^[137] Glycerol weist jedoch fluoreszierende Verunreinigungen bei der Anregungswellenlänge von 488 nm auf, welche FCS-Burst Experimente entscheidend beeinflussen können. Durch Änderung der Anregungswellenlänge auf 520 nm konnten die fluoreszierenden Verunreinigungen durch Glycerol verringert werden (durchgeführt von [REDACTED]). Des Weiteren wurde getestet, ob die Protease in einem Puffer ohne Glycerol aktiv ist und durch Inhibitoren wie gewohnt gehemmt werden kann. Für die mit ATTO 488 und

ATTO 647N markierte S79C-S158C-Protease wurde mit dem nicht-kompetitiven Inhibitor **8** das Verhalten in Puffersystemen mit und ohne Glycerol untersucht.

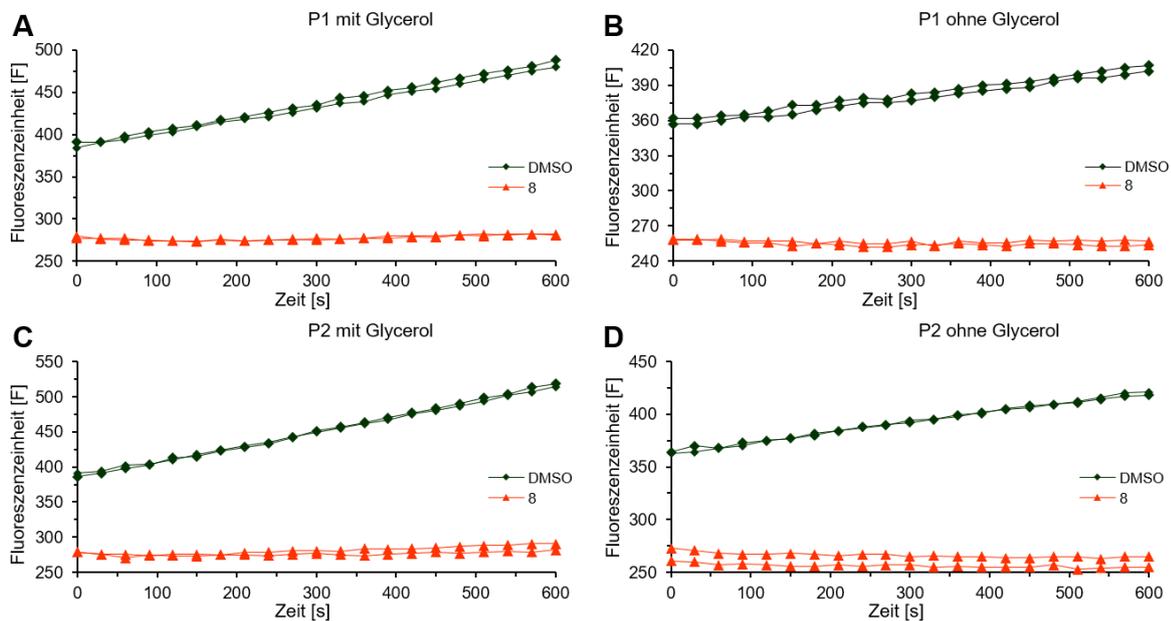


Abbildung 3.18: DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C (ATTO 488, ATTO 647N) Hemmung durch nicht-kompetitiven Inhibitor **8** (orange). **A & B** zeigen die Ergebnisse von Peak1 (P1) mit und ohne Glycerol im Assay-Puffer. **C & D** ist es analog für Peak2 (P2) des NGC™-UV/Vis-Chromatogramms gezeigt (siehe **Abbildung 3.12**).

Abbildung 3.18 verdeutlicht eine weiterhin starke Hemmung ($\sim 100\%$) der Protease durch Verbindung **8** auch ohne Glycerol im Puffer (**B & D**). Es konnte eine leicht verminderte Aktivität der Protease ohne Glycerol verzeichnet werden. Diese sollte sich jedoch nicht wesentlich auf die Messungen auswirken, da die Aktivität nach wie vor durch Inhibitoren beeinflussbar ist.

3.1.2 Fluoreszenzmarkierung des Inhibitors

Parallel zur Markierung der DENV2-NS2B-NS3-Protease wurde eine Strategie entwickelt, wie ein potenzieller Inhibitor so modifiziert werden kann, dass er für FRET-Messungen mit einfach markierter NS2B-NS3-Protease eingesetzt werden kann. Hierbei ist es entscheidend, dass der Inhibitor einerseits synthetisch leicht zugänglich ist und andererseits ausreichend hohe Affinität zur Protease besitzt. Zu Beginn des Projektes wurden daher verschiedene, bereits in der Arbeitsgruppe SCHIRMEISTER vorhandene, potenzielle Inhibitoren für eine Modifizierung berücksichtigt. In **Abbildung 3.19** sind die ausgewählten Derivate mit den entsprechenden IC_{50} -Werten an der DENV2-Protease zusammengefasst.

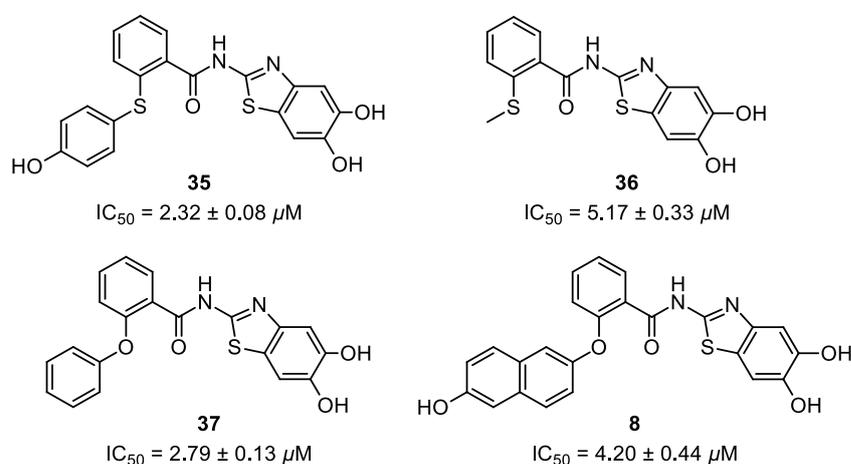


Abbildung 3.19: Mögliche nicht-kompetitive Inhibitoren, die für eine Fluoreszenzmarkierung modifiziert werden sollten. Die IC_{50} -Werte beziehen sich auf die DENV2-NS2B-NS3-Protease und wurden von [REDACTED] und [REDACTED] ermittelt (8^[66]).

Essenziell für die Affinität beziehungsweise Bindung in die allosterische Tasche ist die 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Einheit. Dockingstudien der Strukturen sowohl in der offenen (2FOM) als auch der geschlossenen (2M9P) Form gaben Aufschluss darüber, welche Molekülbereiche für eine Farbstoffmarkierung modifiziert werden können. **Abbildung 3.20 A** verdeutlicht an der Leitstruktur **8**, welche Wechselwirkungen das Molekül in der allosterischen Tasche eingeht. In der offenen (**A** links, 2FOM) aber auch in der geschlossenen Konformation (**A** rechts, 2M9P) ragt neben dem Naphthalinsystem der Aromat der Salicylamidgruppe aus der Tasche heraus. Wird an diesen Positionen das im Vergleich große Farbstoffmolekül angebracht, sollte dies

außerhalb der Bindestelle liegen und für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zugänglich sein.

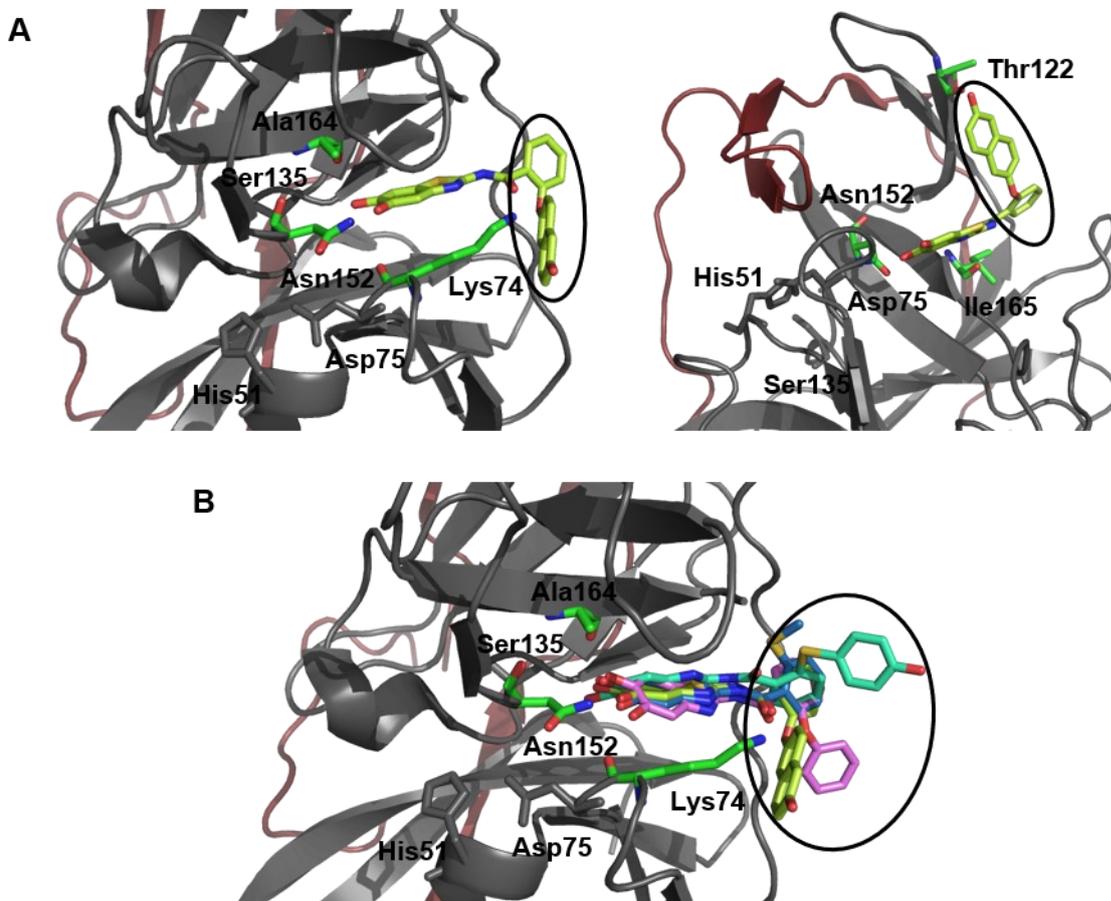


Abbildung 3.20: Docking der potenziellen Inhibitoren für eine Farbstoffmarkierung. NS3 (grau, Cartoon), aktives Zentrum (grau, Sticks), NS2B (rot, Cartoon), essenzielle AS für Bindung in allosterischen Tasche (grün, Sticks), **8** (gelb), **37** (violett), **36** (blau), **35** (türkis). **A**) Bindemodus der Verbindung **8** in der offenen Konformation 2FOM^[44] (links) und der geschlossenen Konformation 2M9P^[47] (rechts). **B**) Überlagerung der Verbindungen **8** und **35-37** in der offenen Konformation 2FOM. Die Grafiken wurden mit PyMOL erstellt.

Abbildung 3.20 B zeigt zudem die annähernd gleiche Ausrichtung aller vier Verbindungen in der offenen Konformation (2FOM). Hier wird ebenfalls deutlich, dass der terminale Substituent des (Thio)Salicylethers (vgl. **Abbildung 3.19**) aus der Tasche heraussteht und somit für eine Farbstoffmarkierung geeignet ist.

Die für eine Kupplung an das Farbstoffmolekül angebrachte funktionelle Gruppe stellt den limitierenden Faktor für die Modifikation des Inhibitors dar. Aufgrund der guten physikalischen und chemischen Eigenschaften wurden ATTO 488 und ATTO 647N (**Abbildung 3.1**) als Farbstoffe in Betracht gezogen. Die kommerziell erhältlichen

Farbstoff-Derivate der Firma *ATTO TEC* besitzen für die Kupplung diverse funktionelle Gruppen mit einem entsprechenden Linker.^[121] Den Linkern (grün) gegenübergestellt sind in **Abbildung 3.21** die entsprechenden funktionellen Gruppen (orange), welche für eine erfolgreiche Umsetzung notwendig sind.

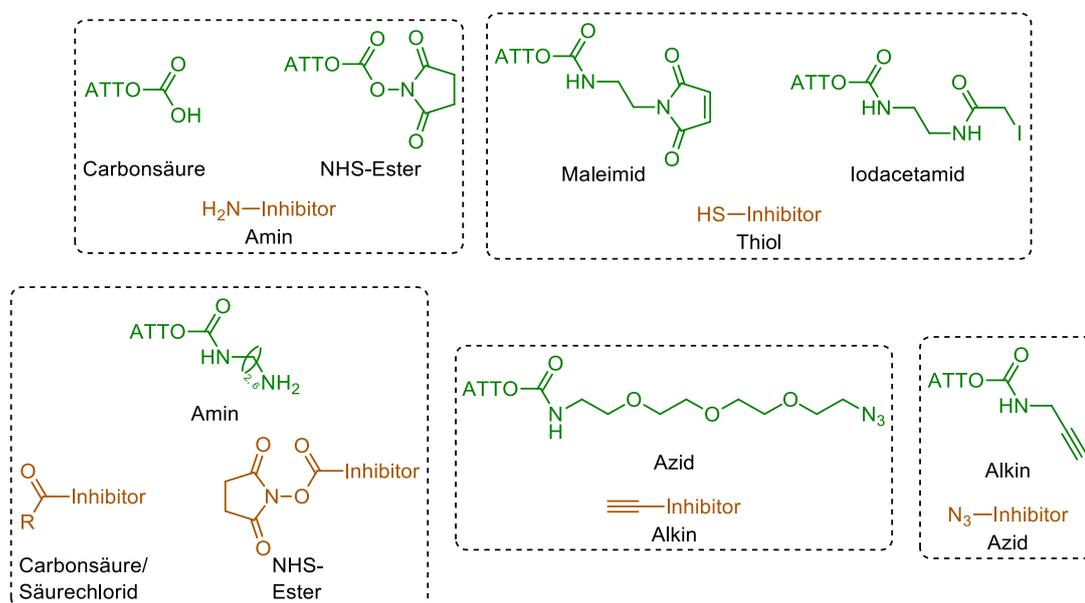


Abbildung 3.21: Funktionelle Gruppen an den Farbstoff-Derivaten (grün) und dafür erforderliche funktionelle Gruppen an den potenziellen Inhibitor-Strukturen (orange).

Da die Fluoreszenzfarbstoffe sehr kostenintensiv sind, sollten die entsprechenden Reaktionsbedingungen für die Umsetzung mit einem funktionalisierten Inhibitor mit Modellsubstanzen (**Abbildung 3.22**) optimiert werden. Im Nachfolgenden wird zunächst die Synthese der Modellsubstanzen vorgestellt, gefolgt von der eigentlichen Inhibitorsynthese.

3.1.2.1 Herstellung der Modellsubstanzen

Die in **Abbildung 3.22** gezeigten Modellsubstanzen wurden synthetisiert oder kommerziell (**38, 42**) erworben.

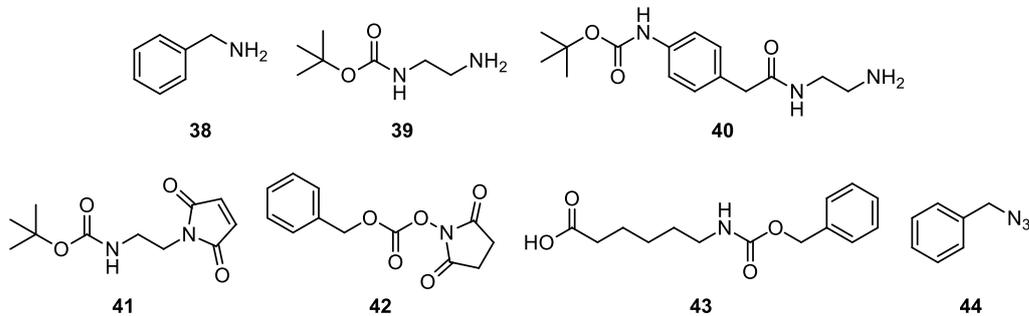
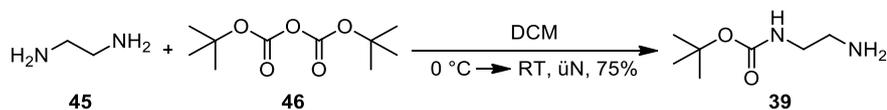


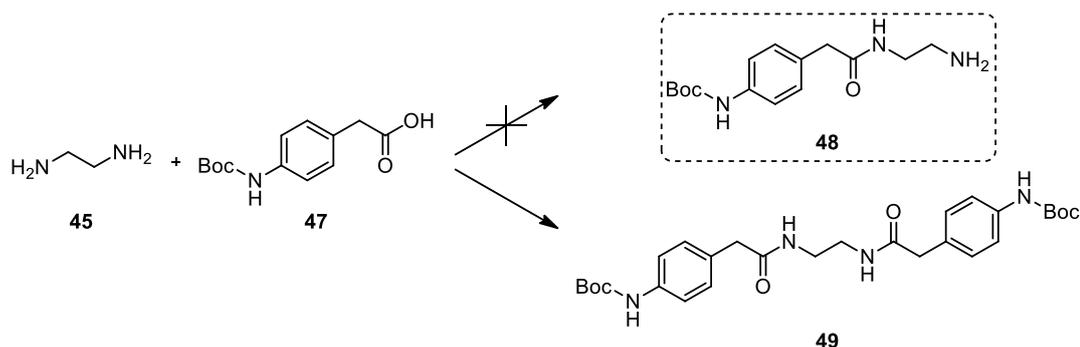
Abbildung 3.22: Modellsubstanzen.

Aufgrund der guten Verfügbarkeit wurde Ethylendiamin **45** als kostengünstige Ausgangssubstanz für die Synthese der Carbamate **39** und **40** verwendet. Um eine doppelte Carbamatbildung zu verhindern, wurde analog zu RICHTER *et al.*^[138] das nucleophile Ethylendiamin (**45**) in einem zehnfachen Überschuss eingesetzt. Die Ausbeute des farblosen Feststoffes *tert*-Butyl-*N*-(2-aminoethyl)carbamate (**39**) betrug 75% (**Schema 3.1**).



Schema 3.1: Synthese von *tert*-Butyl-*N*-(2-aminoethyl)carbamate (**39**) nach RICHTER *et al.*^[138].

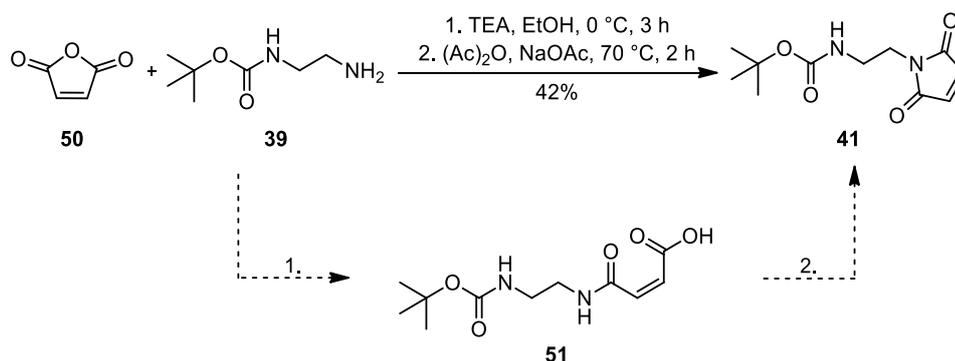
Für das Einführen eines voluminöseren Rests wurde Ethylendiamin (**45**) mit der Verbindung **47** umgesetzt, welche bereits im Rahmen der dieser Doktorarbeit vorangegangenen Diplomarbeit synthetisiert wurde.^[139] Da es sich hierbei um eine wenig reaktive Carbonsäure **47** im Vergleich zu dem aktivierten Ester **46** handelt, sind zusätzlich Kupplungsreagenzien erforderlich. NIKLAS PELTNER führte während seines Forschungspraktikums zunächst eine klassische TBTU-Kupplung durch.^[140] Es wurde an beide Aminogruppen jeweils die Carbonsäure **47** gekuppelt, sodass Verbindung **49** erhalten wurde. In einem weiteren Ansatz wurde analog zur Synthese von **39** Ethylendiamin (**45**) in einem zehnfachen Überschuss verwendet. Es konnte jedoch ebenfalls nicht das gewünschte Produkt **48** isoliert werden. (**Schema 3.2**)



Schema 3.2: Doppelte Kupplung des Ethylendiamins (45) mit einem Phenylessigsäure-Derivat 47 zu 49.

Da es sich hierbei um Modellsubstanzen handelte, wurde auf eine weitere Optimierung der Synthese verzichtet. Die Verbindungen 38 und 39 wurden im Folgenden als Testsubstanzen verwendet.

Ausgehend von Verbindung 39 konnte ebenfalls nach RICHTER *et al.*^[138] 1-((*N-tert*-Butoxycarbonyl)-2-aminoethyl)maleimid (41) hergestellt werden (**Schema 3.3**).

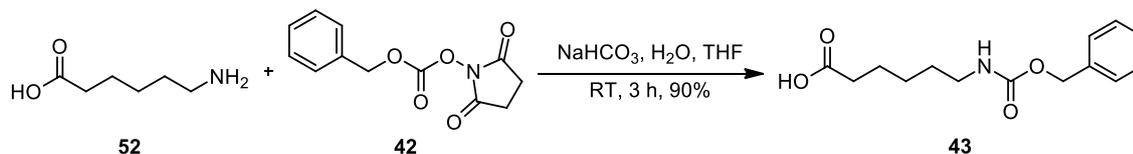


Schema 3.3: Synthese von 1-((*N-tert*-Butoxycarbonyl)-2-aminoethyl)maleimid (41) nach Addition und Ringschluss von 50 und 39.

Der nach einer Additionsreaktion des nucleophilen Amins 39 an Maleinsäureanhydrid 50 entstandene Malonsäureester 51 wurde nicht isoliert. Der Ringschluss erfolgte nach Entfernung des Lösemittels mit anschließender Aufnahme von Essigsäureanhydrid, Natriumacetat und Erhitzen auf 70 °C.^[141] Es wurde eine Ausbeute von 42% (41) erzielt.

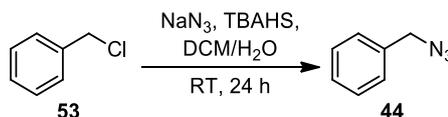
Die kommerziell erworbene Verbindung 42 wurde genutzt, um einen längeren Linker analog zu den Linkern der Fluoreszenzfarbstoffe zu erzeugen. In einer Kupplungsreaktion kann dieser mit einem Amin-Derivat des modifizierten Inhibitors umgesetzt werden. Nach einer Vorschrift von VOSS *et al.* konnte dieser durch

Umsetzung mit ϵ -Aminocaprinsäure (**52**) in einer einstufigen Synthese mit einer Ausbeute von 90% hergestellt werden (**Schema 3.4**).^[142]



Schema 3.4: Herstellung von **43**.

Für eine mögliche 1,3-dipolare Cycloaddition eines mit einem Alkin funktionalisierten Inhibitors wurde Benzylazid (**44**) durch eine nucleophile aromatische Substitution ausgehend vom Benzylchlorid (**53**) hergestellt. Nach einer Methode von ZHENG *et al.*^[143] unter Zuhilfenahme des Phasentransferkatalysators Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) konnte Benzylchlorid (**53**) mit Natriumazid in einem DCM/H₂O-Gemisch zu Benzylazid **44** umgesetzt werden (siehe **Schema 3.5**). Die Ausbeute wurde nicht ermittelt, da das Lösemittel aufgrund des potenziell explosiven Verhaltens nicht vollständig entfernt wurde.



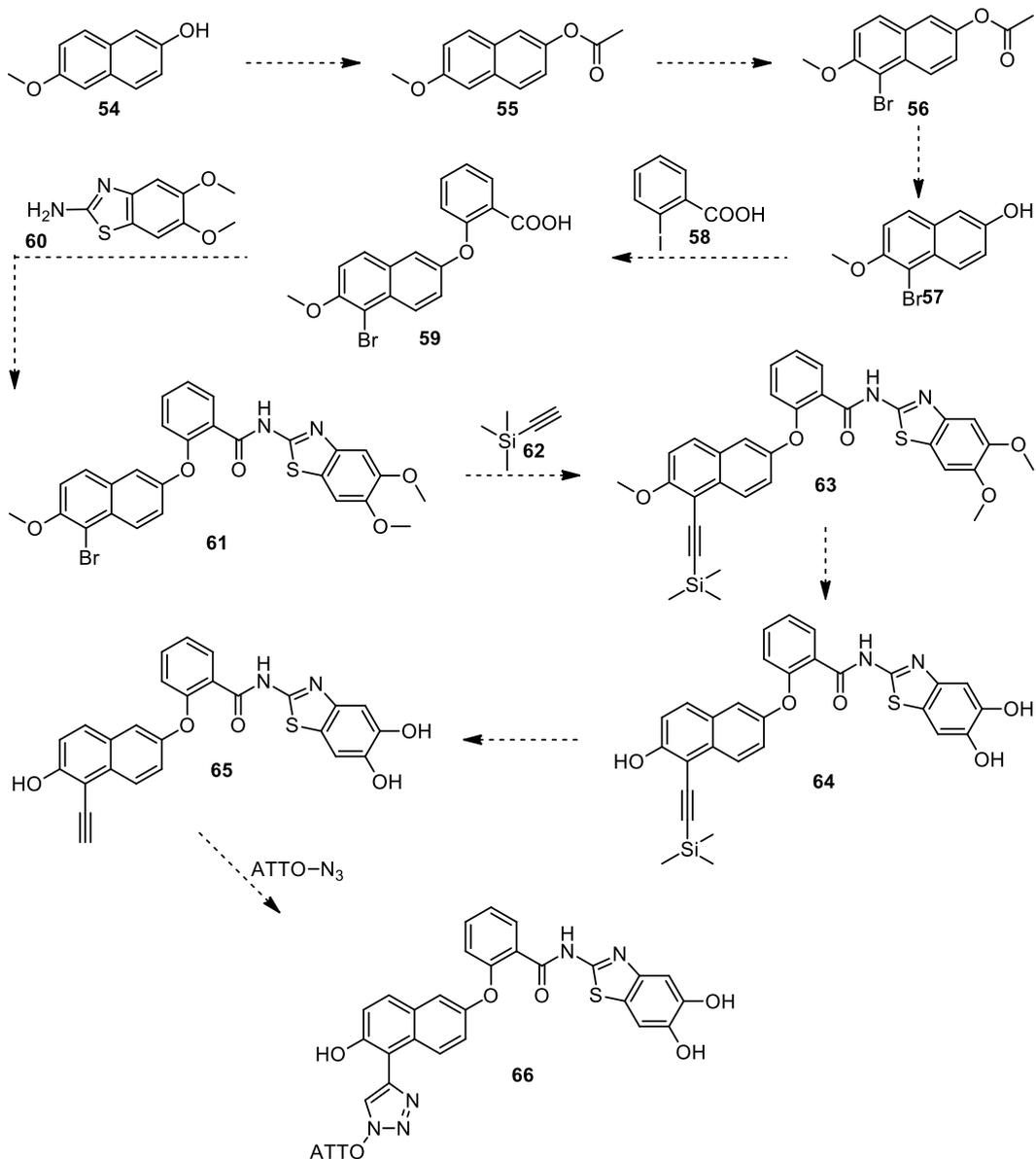
Schema 3.5: Synthese des Benzylazids **44**.

Der Reaktionserfolg konnte einerseits anhand der Verschiebung der CH₂-Gruppe im ¹H-NMR-Spektrum (DMSO-*d*₆, 300 MHz, $\delta = 4.76$ ppm (**53**), 4.44 ppm (**44**)) und andererseits durch die charakteristische Azid-Bande bei 2088 cm⁻¹ im IR-Spektrum nachgewiesen werden.

3.1.2.2 Modifizierung des Inhibitors **8**

Die Derivatisierung der unter **Abbildung 3.19** aufgeführten nicht-kompetitiven Inhibitoren erfolgte zeitlich parallel. Es wird im Folgenden nacheinander auf die Synthesen und Ergebnisse eingegangen und mit der zu diesem Zeitpunkt als Leitstruktur geltenden Verbindung **8** begonnen. Wie in den Docking-Bildern zu sehen ist (vgl. **Abbildung 3.20 A**), kann Verbindung **8** am Naphthalingerüst funktionalisiert werden. Hierfür wurde eine Syntheseroute (**Schema 3.6**) entwickelt, welche eine 1,3-dipolare Cycloaddition ermöglicht. Diese konzertiert ablaufende Reaktion

zwischen einem Azid und einem Alkin nach KOLB und SHARPLESS^[144] ist eine der grundlegenden Reaktionen der sogenannten „Click-Chemie“ und findet häufig Anwendung in der Wirkstoffforschung- und Entwicklung. Diese Reaktion erfüllt wichtige Kriterien, die auch in Bezug auf die Umsetzung mit einem kostenintensiven Fluoreszenzfarbstoff von Vorteil sind. Anforderungen an die „Click-Chemie“ sind: Generierung hoher Ausbeuten, einfache Reaktionsbedingungen (unempfindlich gegenüber Wasser oder Sauerstoff), Erzeugung unbedenklicher Nebenprodukte, welche durch nicht-chromatographische Methoden entfernt werden können und Produkte, die unter physiologischen Bedingungen stabil sind.^[144] Daher wurde dieser Reaktionstyp für die Darstellung der Verbindung **66 (Schema 3.6)** gewählt.

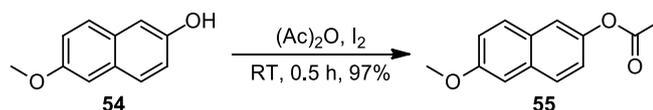


Schema 3.6: Geplante Synthese des Derivates **66** mit einer 1,3-dipolare Cycloaddition im letzten Schritt der Synthese.

Die Einführung der für die Click-Reaktion notwendigen Alkylgruppe erfordert eine achtstufige Synthese wobei im neunten Schritt die Umsetzung mit einer Modellschubstanz bzw. dem Farbstoff erfolgen sollte (**Schema 3.6**). Zunächst sollte die freie Hydroxygruppe des 2-Naphtholderivates **54** acetyliert und anschließend selektiv an C-5 der Verbindung **55** bromiert werden. Ein Schlüsselschritt der Syntheseroute stellt die Ullmann-Kupplung dar, welche nach Entfernung der Methylschutzgruppe erfolgen soll. Das Grundgerüst des Inhibitors **8** kann nach Kupplung mit Baustein **60** erhalten werden. Mittels Palladium-katalysierter Sonogashira-Kreuzkupplung sollte Brom durch Trimethylsilylacetylen **62** ersetzt werden, gefolgt von der Abspaltung der

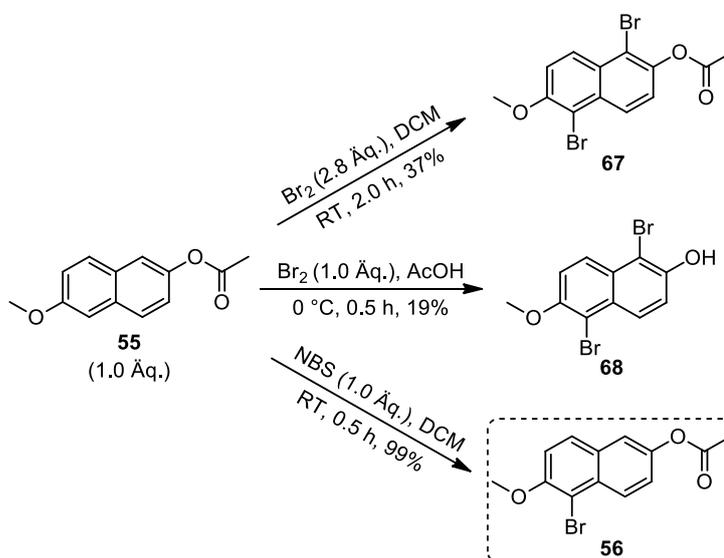
Methylschutzgruppen, um das Catecholgerüst zu generieren. Nach Entfernung der Trimethylsilylgruppe ist Verbindung **65** mit terminalem Alkin anschließend zugänglich für eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit einem entsprechenden Azid.

Die Acetylierung im ersten Schritt erfolgte in Anlehnung an HUANG *et al.*^[145] unter Verwendung katalytischer Mengen an Iod (**Schema 3.7**).



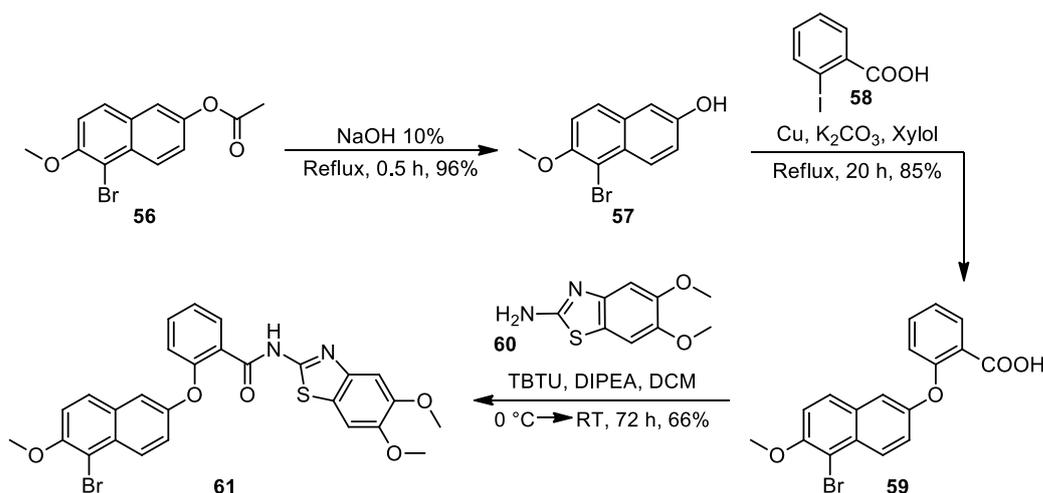
Schema 3.7: Acetylierung von **54**.

Die darauffolgende Bromierung an Position C-5 nach JOHANSEN *et al.*^[146] mit Brom führte nicht zu dem gewünschten Produkt **56**. Durch einen ca. dreifachen Überschuss von Brom erfolgte eine Dibromierung in Position eins und fünf (**67**). Die Reduktion der Äquivalente, sowie eine Anpassung der Reaktionszeit und der Reaktionstemperatur nach MALAMAS *et al.*^[147] führten ebenfalls zum gleichen Substitutionsmuster, wobei zusätzlich die Acetylgruppe abgespalten wurde (**68**). Durch den Einsatz des milderen Bromierungsreagenzes *N*-Bromsuccinimid (NBS) konnte schließlich **56** in einer Ausbeute von 99% erhalten werden (**Schema 3.8**).^[148]



Schema 3.8: Bromierungsversuche in Position C-5.

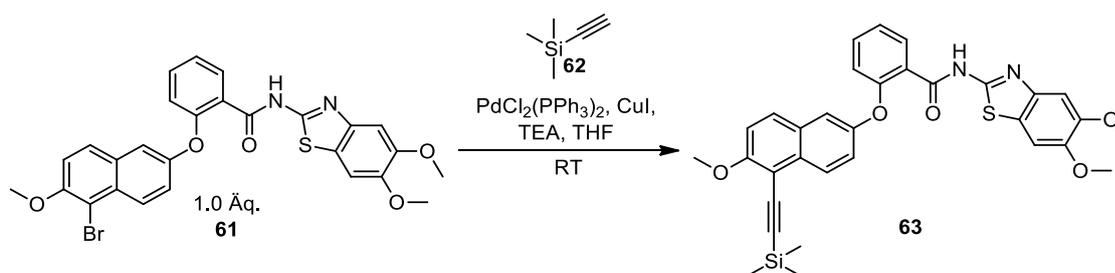
Der basischen Deblockierung mit 10%iger Natriumhydroxidlösung folgten die Ullmann- sowie die TBTU-Kupplung zur Verbindung **61** (**Schema 3.9**).^[140,149,150] Diese Reaktionsschritte waren in moderaten Ausbeuten reproduzierbar.



Schema 3.9: Deacetylierung, Ullmann- und TBTU-Kupplung zur Darstellung von **61**.

Die von SONOGASHIRA^[151] (Sonogashira-(Hagihari)-Kreuzkupplung) etablierte Palladium(II)-katalysierte Transmetallierungsreaktion sollte für die Darstellung der Verbindung **63** angewandt werden. Die zusätzlich durch Kupfer(I)iodid katalysierte sp^2 - sp Kupplung findet dabei zwischen dem Arylhalogenid **61** und dem terminalen Alkin **62** statt. Durch den Zusatz von Kupfer ist es möglich, diese Reaktion bei milderen Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur) im Vergleich zur Heck-Reaktion (100 °C) durchzuführen.^[152,153] Die getesteten Reaktionsbedingungen für die Darstellung der Verbindung **63** sind in **Tabelle 3.12** zusammengefasst.

Tabelle 3.12: Versuche zur Transmetallierung.



#	Reaktionsbedingungen					Reaktionszeit (h)	Umsatz
	62	Pd-Kat	CuI	TEA	THF		
1	1.5 Äq.	5 mol%	5 mol%	3.0 Äq.	LM	24	/
2	3.0 Äq.	5 mol%	10 mol%	LM	LM	96	gering

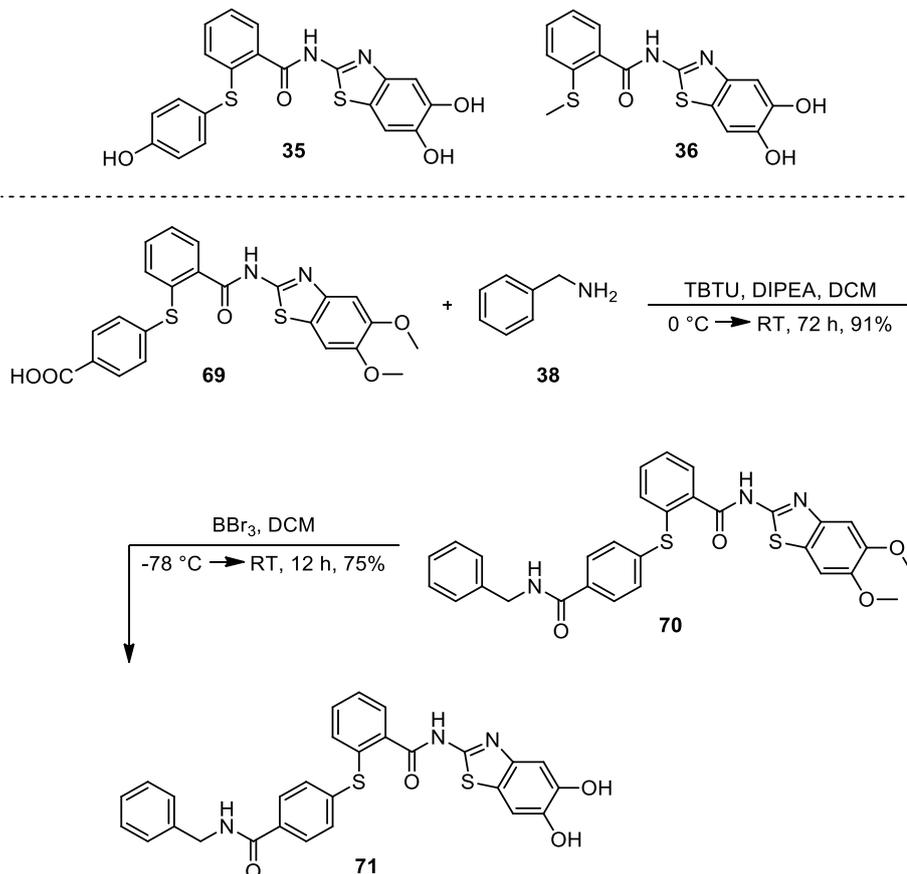
In einem ersten Ansatz wurden nach YOSHIDA *et al.*^[154] jeweils 5 mol% der Katalysatoren eingesetzt. Der nach 24 h per Dünnschichtchromatographie als mögliches Produkt identifizierte Produktfleck konnte nicht isoliert werden. Es wurde lediglich verunreinigtes Ausgangsmaterial **61** zurückgewonnen. Um in einem erneuten Ansatz die Bildung des Kupferacetylids zu fördern, wurde zum einen die doppelte

Menge Kupfer(I)iodid und zum anderen ein Überschuss der Base als Lösemittel eingesetzt. Nach ca. 96 Stunden konnte das gewünschte Produkt **63** per LC-MS-Analyse nachgewiesen werden. Dies enthielt jedoch einen hohen Anteil an Verunreinigungen und konnte nicht sauber isoliert werden. Die schlechte Umsetzung des Arylbromids **61** mit dem terminalen Alkin **62** kann unter anderem in der Reaktivität des Arylbromids begründet sein. Arylbromide sind grundsätzlich weniger reaktiv als beispielsweise Vinyl-Halogenide oder Aryliodide. Des Weiteren unterstützen elektronenziehende Gruppen (-CHO, -COOMe) in *ortho*- oder *para*-Position die Reaktion und nicht wie hier die elektronenschiebende Methoxygruppe in *ortho*-Position.^[152,153] Im nächsten Schritt sollten daher die Reaktionsbedingungen verändert werden, sodass die Reaktion unter Reflux durchgeführt werden konnte. Dies wiederum erhöht die Ausbildung von unerwünschten Homokupplungsprodukten des terminalen Alkins.^[153,155] Zu diesem Zeitpunkt wurde von [REDACTED]^o festgestellt, dass die Leitstruktur **8** starken Einfluss auf die mit ATTO 647N markierte G14C-Protease nimmt. Sowohl bei Ensemblemessungen als auch bei Messungen auf Einzelmolekülniveau wurde beobachtet, dass die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebenszeit von ATTO 647N durch die Zugabe der Verbindung **8** massiv einbrechen. Im Ensemble war es dennoch möglich, Veränderungen der spektralen Eigenschaften durch Zugabe des Inhibitors **8** zu beobachten. Auf Einzelmolekülebene hingegen konnten Änderungen spektroskopischer Fluoreszenzparameter aufgrund des starken Intensitätseinbruchs durch die Verbindung **8** nicht aussagekräftig ausgewertet werden. Daher ist eine Bestimmung der Bindekinetik und Bindungskonstante nicht möglich. In weiteren Experimenten wurde zudem der Einfluss von Verbindung **8** auf den freien Fluoreszenzfarbstoff Cy5 untersucht. Diese zeigten ein ähnliches, wenn auch nicht so stark ausgeprägtes, Verhalten bezüglich der Fluoreszenzintensität. Die geplante Syntheseroute (vgl. **Schema 3.6**) wurde aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass bereits verbesserte Inhibitoren zur Verfügung standen, nicht weiterverfolgt (vgl. Abschnitt 3.1.2.5).

^o In Zusammenarbeit mit den Modulanten [REDACTED].

3.1.2.3 Modifizierung der Inhibitoren 35 und 36

Basierend auf Verbindung **35** bzw. **36** (Schema 3.10, oben) sollte das über ein Thiosalicylsäureamid verknüpfte 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Grundgerüst erhalten bleiben. Über eine Carboxygruppe (vgl. **69**) sollte die Modells substanz (**38**) eingeführt werden (Schema 3.10, unten), um die Reaktionsbedingungen zu evaluieren.



Schema 3.10: Umsetzung der Verbindung **69** mit der Modells substanz **38** zur Testverbindung **71** (unten) basierend auf den Ausgangstrukturen **35** und **36** (oben).

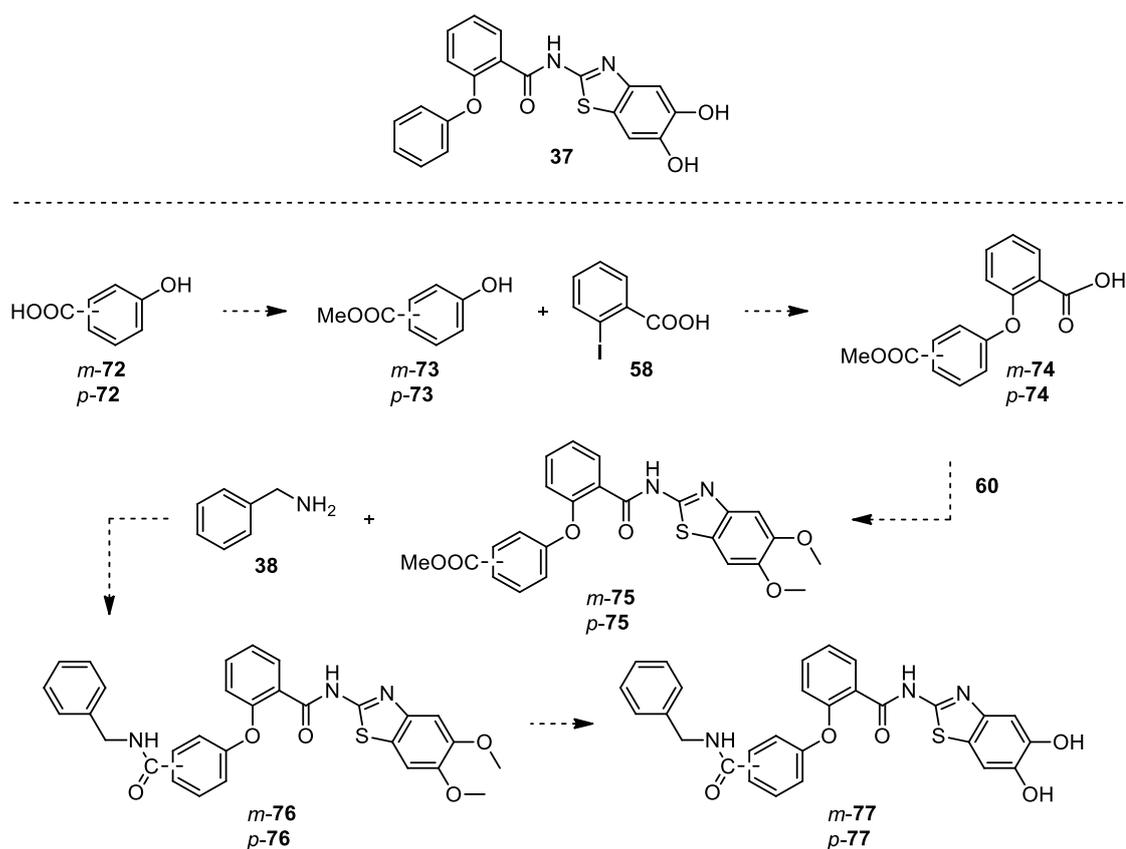
Die Verbindung **69** wurde von [REDACTED] im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert und zur Verfügung gestellt. In der zweistufigen Synthese wurde das gewünschte Produkt **71** nach TBTU-Kupplung und Entfernung der Methylschutzgruppen mit einer Ausbeute von 75% hergestellt und in einem fluorimetrischen Assay an der DENV2-NS2B-NS3-Protease getestet (vgl. Abschnitt 3.1.2.6).

Nachdem von Leitstruktur **8** bekannt war (vgl. Abschnitt 3.1.2.2), welchen Einfluss diese auf den Farbstoff nimmt, wurde diesbezüglich Verbindung **71** untersucht. Es zeigte sich auch hier ein starker Einbruch der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes

ATTO 647N, sodass auch diese Verbindung für eine Umsetzung mit einem Fluoreszenzfarbstoff nicht weiter in Frage kam. Möglicherweise sind hydrophobe Wechselwirkungen der mäßig hydrophilen Verbindungen **8** und **71** mit dem ebenfalls wenig hydrophilen Fluoreszenzfarbstoff ursächlich für diese Beobachtung. Daher wurde an dieser Stelle auf neue Derivate zurückgegriffen, welche einen hydrophileren Charakter haben (siehe Abschnitt 3.1.2.5).

3.1.2.4 Modifizierung des Inhibitors 37

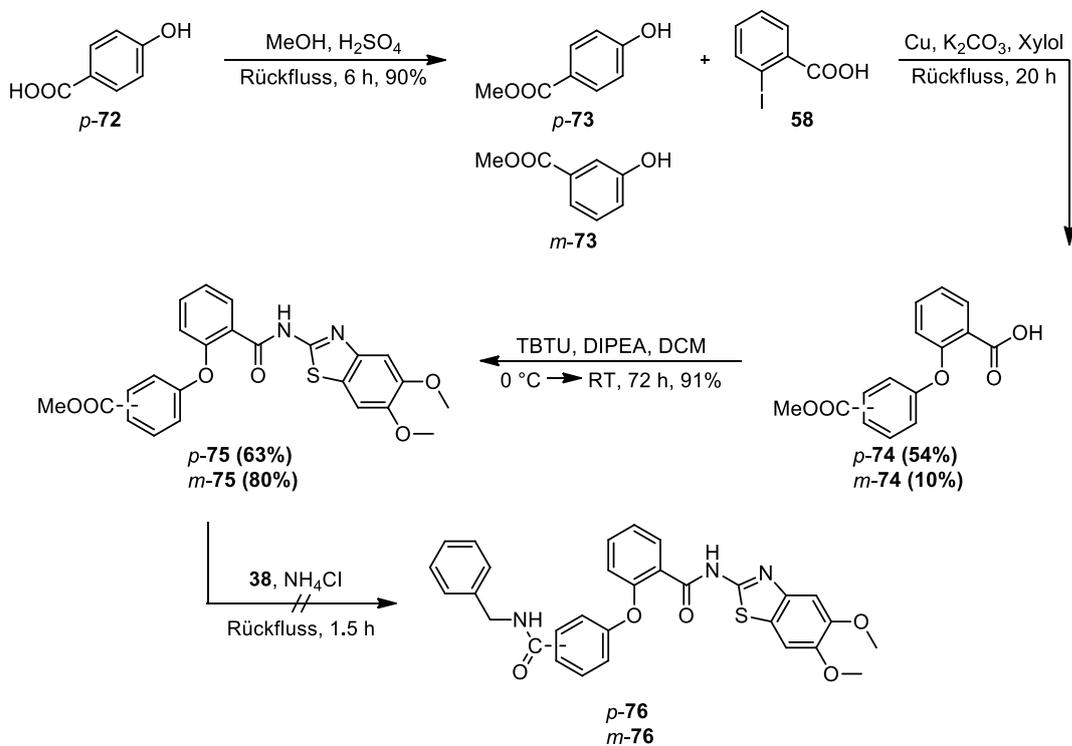
Die Derivatisierung der Ausgangsverbindung **37** (**Schema 3.11**) wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von [REDACTED] durchgeführt.^[156] Geplant war die Einführung einer Carboxygruppe in *para*- und *meta*-Stellung des Salicylsäureethers gefolgt von einer Umsetzung mit der neu eingeführten Säuregruppe mit Benzylamin **38** (**Schema 3.11**).



Schema 3.11: Geplante Synthese zur Derivatisierung der Verbindung **37**.

Die säurekatalysierte Veresterung der Carbonsäuren *p*-72 mit Methanol erfolgte dabei wie erwartet mit einer Ausbeute von 90%. Der anschließende Schlüsselschritt, die

Ullmann-Kupplung führte sowohl für *p*-74 als auch für *m*-74 (kommerziell erworben) zu geringen Ausbeuten (< 10%). Standardmäßig wurde bisher das Produkt durch Ausfällung mit Salzsäure bei einem pH-Wert von 1–2 gewonnen und gegebenenfalls säulenchromatographisch gereinigt. Eine stufenweise Ausfällung bei pH 6, pH 4 und pH 1–2 führte schließlich zu einer erhöhten Ausbeute des gewünschten Produktes (*p*-74 ~ 40%, pH 4). Des Weiteren wurde festgestellt, dass es bei pH 1–2 zu einer Deblockierung des Esters kam. Dies erklärt die geringe Ausbeute der ersten Versuche. Die Darstellung von *m/p*-75 mittels TBTU-Kupplung verlief in moderaten Ausbeuten (**Schema 3.12**).



Schema 3.12: Versuch zur Darstellung der Derivate *para*- und *meta*-76.

Das gewünschte Produkt der Aminolyse des Esters mit Benzylamin konnte massenspektrometrisch nachgewiesen, jedoch nicht isoliert werden. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurden vor allem die folgenden Derivate erhalten.

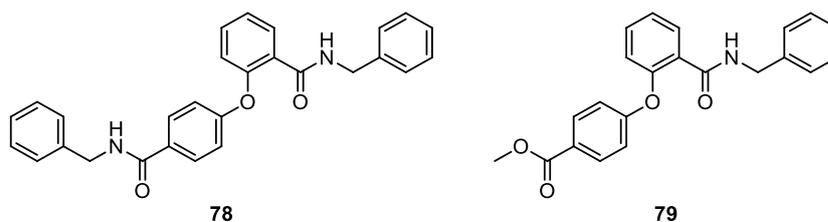


Abbildung 3.23: Hauptprodukte nach Aminolyse mit Benzylamin.

Die unter Rückfluss durchgeführte Aminolyse führte zusätzlich zu einer Transamidierung des Benzothiazols durch Benzylamin. Im Allgemeinen sind für diese Reaktionen Metallkatalysatoren (Pd, Ni, Cu usw.) oder längere Reaktionszeiten bei erhöhten Temperaturen notwendig.^[157] Bei den im Vergleich kurzen Reaktionszeiten von 1,5 Stunden unter Rückfluss sollten die Verbindungen **78** und **79** lediglich als Nebenprodukte und nicht als Hauptprodukte entstehen. Zu diesem Zeitpunkt wurde von [REDACTED] die unter Abschnitt 3.1.2.3 synthetisierte analoge Verbindung **71** untersucht. Da diese zu einem Einbruch der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes ATTO 647N führte, wurde auf eine Syntheseoptimierung verzichtet (vgl. Diskussion unter Abschnitt 3.1.2.3).

3.1.2.5 Modifizierung neuer Inhibitoren

Parallel zu den unter Abschnitt 3.1.2.2–3.1.2.4 aufgeführten Synthesen wurde von [REDACTED]^[45] die Entwicklung neuer nicht-kompetitiver Inhibitoren für die NS2B-NS3-Protease vorangetrieben. Ziel seiner Arbeit war es unter anderem, die Lipophilie und die damit einhergehende geringe Wasserlöslichkeit der Leitstruktur **8** durch Optimierung der Grundstruktur zu verbessern. Hierfür wurde das 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Grundgerüst beibehalten und der Diarylether wurde durch Prolin ersetzt (**Abbildung 3.24**).

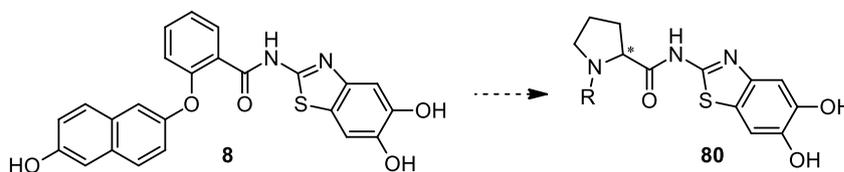


Abbildung 3.24: Optimierung der Leitstruktur **8** durch Einführung eines Prolins. Entsprechende Strukturen für die Reste „R“ sind bei Millies *et al.*^[45] aufgeführt.

Die sich daraus ergebenden Vorteile hinsichtlich der Löslichkeit, aber auch der synthetisch leichteren Zugänglichkeit wurden genutzt, um neue Moleküle zu

entwickeln, welche für eine Farbstoffmarkierung besser geeignet sind. Neben dem 5,6-Dihydrobenzo[*d*]thiazol-Grundgerüst (**80**) wurde ebenfalls das 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Grundgerüst in Betracht gezogen. Dies ist synthetisch einfacher zugänglich und zeigte ebenfalls moderate Inhibition. **Abbildung 3.25** gibt eine Übersicht über potenzielle neue Verbindungen, welche für die Umsetzung mit Modellsubstanzen (vgl. 3.1.2.1) bzw. Fluoreszenzfarbstoffen in Erwägung gezogen wurden.

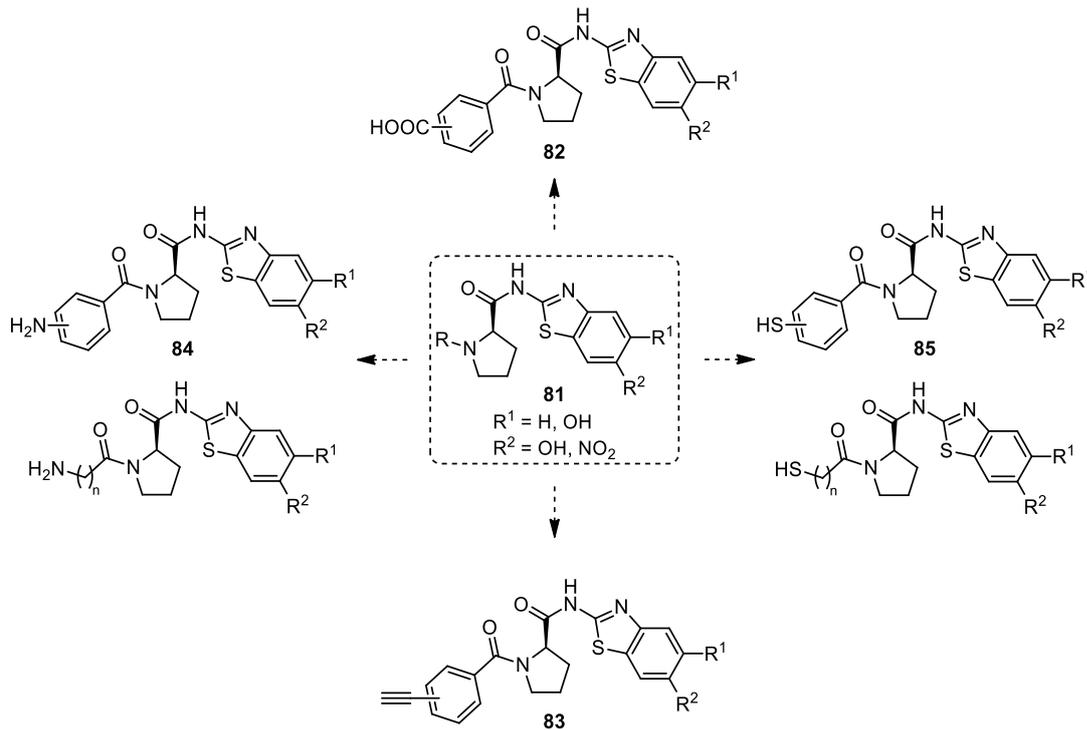
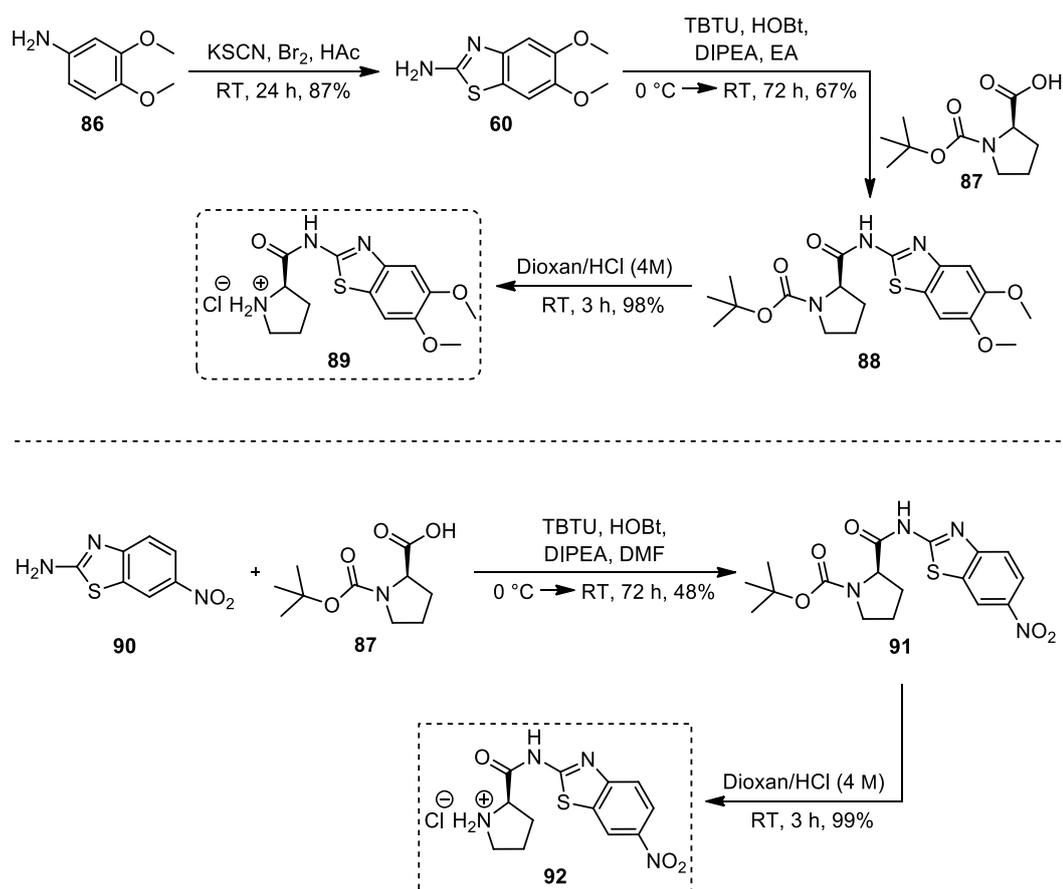


Abbildung 3.25: Neue potenzielle Verbindungen basierend auf Prolin-Derivaten.

Für die Darstellung dieser Derivate (**Abbildung 3.25**) mussten zunächst die Synthesebausteine basierend auf dem Grundbaustein **81** synthetisiert werden. Anschließend sollten die Derivate mit den Modellsubstanzen umgesetzt und in einem fluorimetrischen Assay an der DENV2-NS2B-NS3-Protease getestet werden. Da die Stereochemie des Prolins im Wesentlichen keinen Einfluss auf die Inhibition hat, wurde das zu Beginn der Synthesen in größeren Mengen vorhandene *N*-Boc-D-Prolin als Ausgangssubstanz verwendet (vgl. Dissertation [redacted]).^[136]

Darstellung der Synthesebausteine

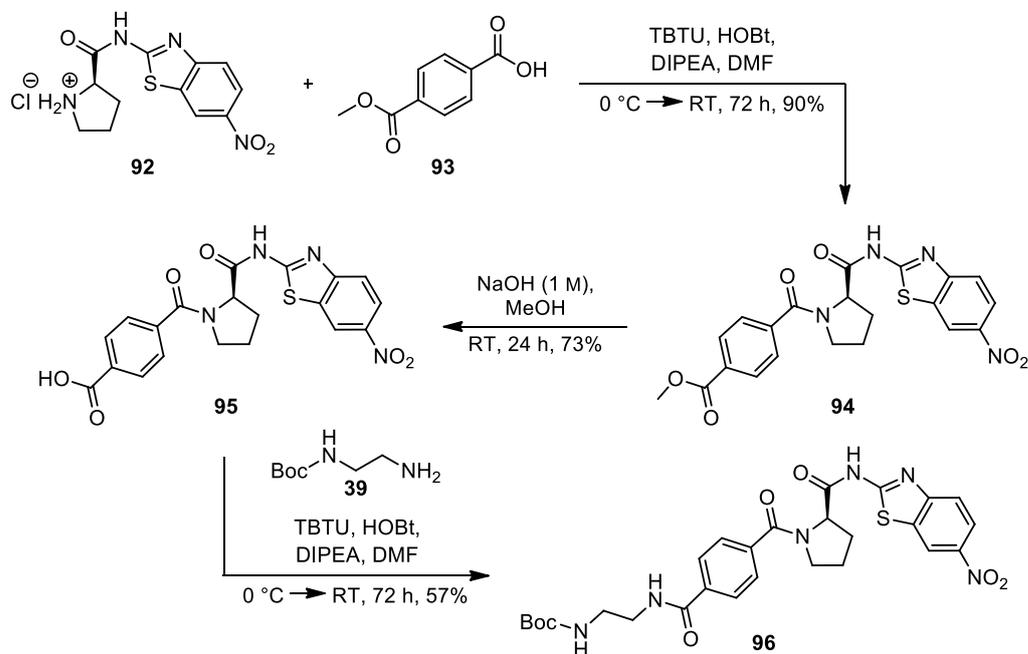
Im ersten Schritt der dreistufigen Synthese zum Aufbau des Dimethoxybenzothiazol-Grundgerüsts wurde 3,4-Dimethoxyanilin (**86**) mit Kaliumthiocyanat und Brom umgesetzt. Das *in situ* gebildete Pseudohalogenid Dirhodan ermöglicht den Ringschluss zum 5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol (**60**).^[158] Die anschließende TBTU-Kupplung mit *N*-Boc-D-Prolin (**87**) sowie die selektive Entfernung der Boc-Schutzgruppe mit Dioxan/HCl (4 M) lieferte das gewünschte Ammoniumsalz **89**. Die Racemisierung des Prolins während der Kupplung wurde durch den Zusatz von HOBT unterbunden, da sich dadurch der Aktivester schneller ausbildet. Die Darstellung des 6-Nitro-substituierten Grundgerüsts **92** erfolgte analog in einer zweistufigen Synthese ausgehend von 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol, welches kommerziell erworben wurde (**Schema 3.13**).



Schema 3.13: Synthese der Grundgerüste mit Prolin: oben 5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol (**89**), unten 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol (**92**).

Einführung einer Carboxy-Funktion für eine Amidkupplung zum Derivat **96**

Ausgehend von Synthesebaustein **92** sollte in einer zweistufigen Synthese das mit einer Carbonsäure funktionalisierte Derivat **95** hergestellt und anschließend mit der Modellschubstanz **39** umgesetzt (**Schema 3.14**) werden. Im ersten Schritt wurde eine TBTU-Kupplung mit hohen Ausbeuten durchgeführt (**94**, 90%), gefolgt von einer basischen Hydrolyse des Methylesters mit Natriumhydroxid, welche ebenfalls gute Ausbeuten lieferte (**95**, 73%). Die Umsetzung mit der Modellschubstanz **39**, ebenfalls in einer TBTU-Kupplung, lieferte das gewünschte Produkt **96** durch Ausfällung aus dem Reaktionsgemisch mit Wasser. Die Ergebnisse des fluorimetrischen Assays an der DENV2-NS2B-NS3-Protease werden im Kapitel 3.1.2.6 diskutiert.

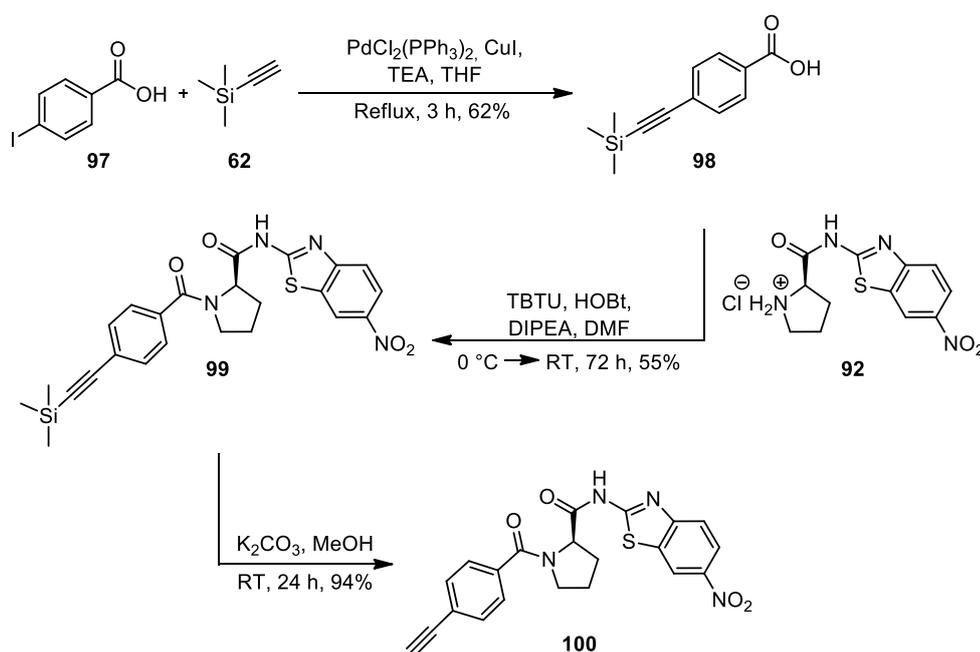


Schema 3.14: Darstellung der Verbindung **96**.

Darstellung der Alkin-Derivate **101** und **102**

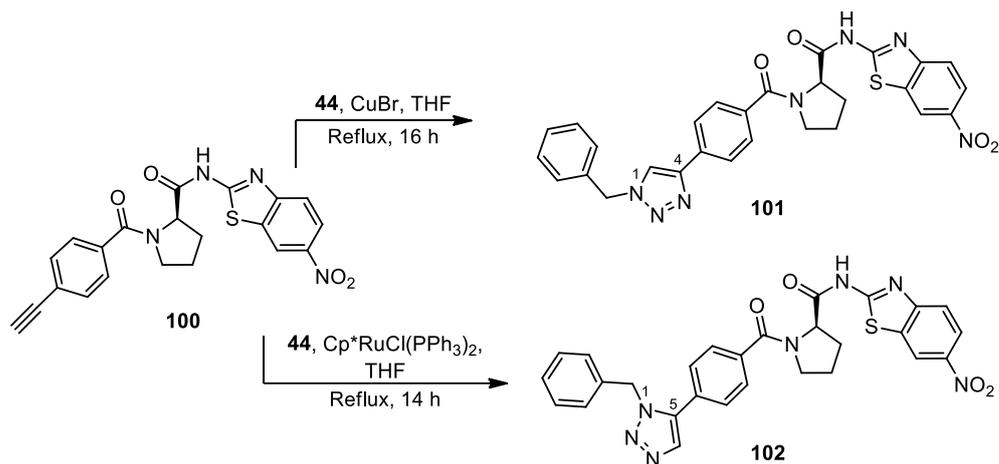
Der bereits für Verbindung **8** geplante Ansatz der „Click-Chemie“ über eine 1,3-dipolaren Cycloaddition wurde erneut aufgegriffen, um die Vorteile dieser Reaktion zu nutzen (vgl. Abschnitt 3.1.2.2). Die Synthese startete mit der bis dahin noch nicht erfolgreich durchgeführten SONOGASHIRA-Reaktion zur Einführung einer terminalen Alkin-Gruppe. In diesem Fall wurde 4-Iodbenzoesäure (**97**) als reaktiveres Aryl-Derivat im Vergleich zum Aryl-Bromid **56** eingesetzt.^[153] VIVAS *et al.*^[159] erzielte mit dem entsprechenden Iodbenzoesäuremethylester eine Ausbeute von 99%. Unter

Einsatz von 5 mol% des Palladiumkatalysators und 10 mol% des Kupferkatalysators in refluxierendem THF gelang es **98** in einer Ausbeute von 62% zu gewinnen. Die Ausbeute fällt vermutlich geringer aus, da zum einen der elektronenziehende negative mesomere Effekt der Carbonsäure in para-Position geringer ist als der des Methylesters und zum anderen zusätzlich durch die Deprotonierung durch Triethylamin verringert wird.^[152] Die anschließende TBTU-Kupplung sowie die Entfernung der Trimethylsilyl-Schutzgruppe verliefen in moderaten bzw. guten Ausbeuten (**Schema 3.15**).



Schema 3.15: Syntheseroute zur Herstellung der Alkin-Spezies **100**.

Die 1,3-dipolare Cycloaddition nach HUISGEN zur Darstellung von 1,2,3-Triazolen erfordert aufgrund der häufig hohen Aktivierungsenergie höhere Temperaturen, wodurch ein Gemisch der Regioisomere entsteht.^[160] Die Kupfer(I) katalysierte Variante der Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) liefert dabei die 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazole, wohingegen der Einsatz eines Rutheniumkatalysators wie $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ zum 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazol führt.^[160,161] Für die Umsetzung des Alkins **100** mit Benzylazid **44** wurden beide Möglichkeiten getestet (**Schema 3.16**).



Schema 3.16: Varianten der 1,3-dipolaren Cycloaddition unter Verwendung von Kupfer(I)- und Rutheniumkatalysator.

Das 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazol **101** wurde in Anlehnung an YAMADA *et al.*^[162] unter Verwendung von Kupfer(I)bromid (5 mol%) in Tetrahydrofuran unter Rückfluss synthetisiert. Nach Extraktion mit Dichlormethan konnte das Produkt mittels LC-MS nachgewiesen, jedoch nicht in ausreichender Menge isoliert werden, um ein aussagekräftiges NMR-Spektrum zu erhalten, mit dem die korrekte Verknüpfung bestätigt werden konnte.

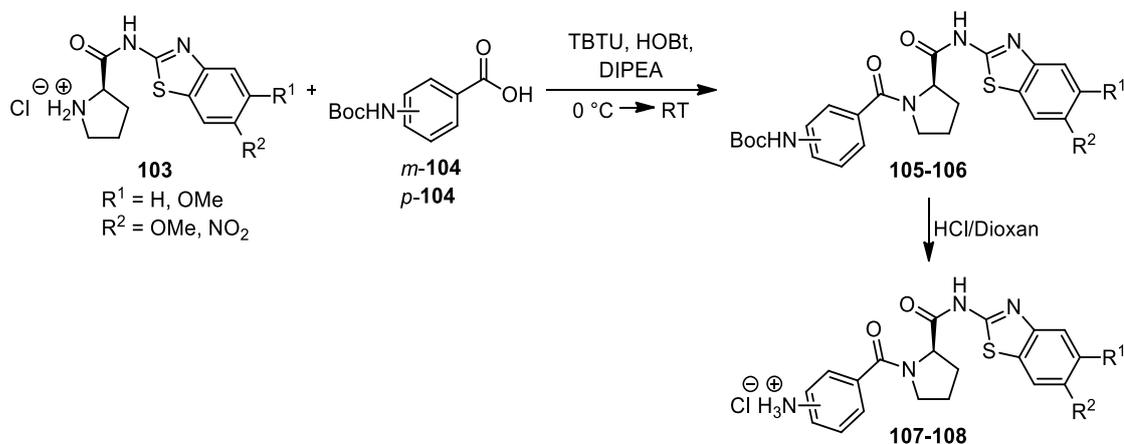
Die Umsetzung mit Cp*RuCl(PPh₃)₂ (1 mol%) nach ZHANG *et al.*^[160] zur Darstellung des 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazols **102** wurde in Dioxan und ebenfalls unter Rückfluss durchgeführt. In einem ersten Ansatz konnte das Produkt lediglich per LC-MS nachgewiesen, aber nicht isoliert werden. In einem weiteren Versuch konnte nach säulenchromatischer Reinigung das gewünschte Produkt erhalten werden. Das UV-Signal der LC-MS zeigt jedoch, dass es sich um ein Produktgemisch handelt, da zwei Peaks (ca. 46% zu 54%) mit den gleichen Massen zu finden sind. Des Weiteren konnte auch hier nicht ausreichend Substanz für ein NMR-Spektrum isoliert werden. Eine mögliche Ursache für das Produktgemisch ist die erforderliche Reaktionszeit von 14 Stunden bei ca. 80 °C, anstelle der empfohlenen zwei bis vier Stunden.^[160] Da bei beiden Variationen nicht annähernd zufriedenstellende Ergebnisse erhalten wurden und andere Syntheserouten zur Modifizierung eines Inhibitors (Amin/Thiol-Derivate) vielversprechendere Ergebnisse zeigten, wurde die Optimierung dieser Synthese nicht weiterverfolgt.

Einführung von Arylamin-Resten für Amidkupplungen und Umsetzungen mit NHS-Estern

Für die Ausbildung einer stabilen Amidbindung können neben den klassischen Kupplungsreagenzien (TBTU, EDC, HATU usw.), *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) eingesetzt werden. Diese hydrolysestabilen Verbindungen werden beispielsweise für Fluoreszenzmarkierungen primärer Aminen an Proteinoberflächen eingesetzt.^[163,164]

Für diesen Ansatz der Modifizierung wurden zunächst die Grundstrukturen mit Prolin/6-Nitrobenzo[*d*]thiazol und Prolin/5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol mit einem primären aromatischen Amin in *para*- bzw. *meta*-Position verknüpft. Im ersten Schritt erfolgte die Umsetzung der Prolinderivate in einer TBTU-Kupplung mit den Boc-geschützten *m*- und *p*-Aminobenzosäuren (*m*-**104**, *p*-**104**) gefolgt von der Entfernung der Boc-Schutzgruppe in Dioxan/HCl (**Tabelle 3.13**).

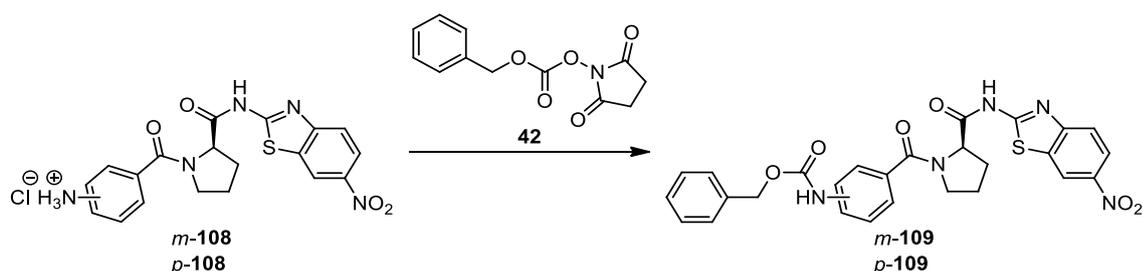
Tabelle 3.13: Syntheseübersicht zur Darstellung der Aminderivate mit entsprechenden Substitutionsmustern und Ausbeuten.



Verbindung	R ¹	R ²	Ausbeute %
<i>m</i> - 105	OMe	OMe	95
<i>p</i> - 105	OMe	OMe	47
<i>m</i> - 106	H	NO ₂	88
<i>p</i> - 106	H	NO ₂	92
<i>m</i> - 107	OMe	OMe	68
<i>p</i> - 107	OMe	OMe	98
<i>m</i> - 108	H	NO ₂	99
<i>p</i> - 108	H	NO ₂	99

In einem ersten Versuch wurden die Verbindungen *m*-**108** und *p*-**108** in einem Verhältnis 1:1 zum NHS-Ester **42** eingesetzt (vgl. **Tabelle 3.14**).

Tabelle 3.14: Reaktionsbedingungen für die Umsetzung der primären aromatischen Amine *m*-**108** und *p*-**108** mit dem NHS-Ester **42**.

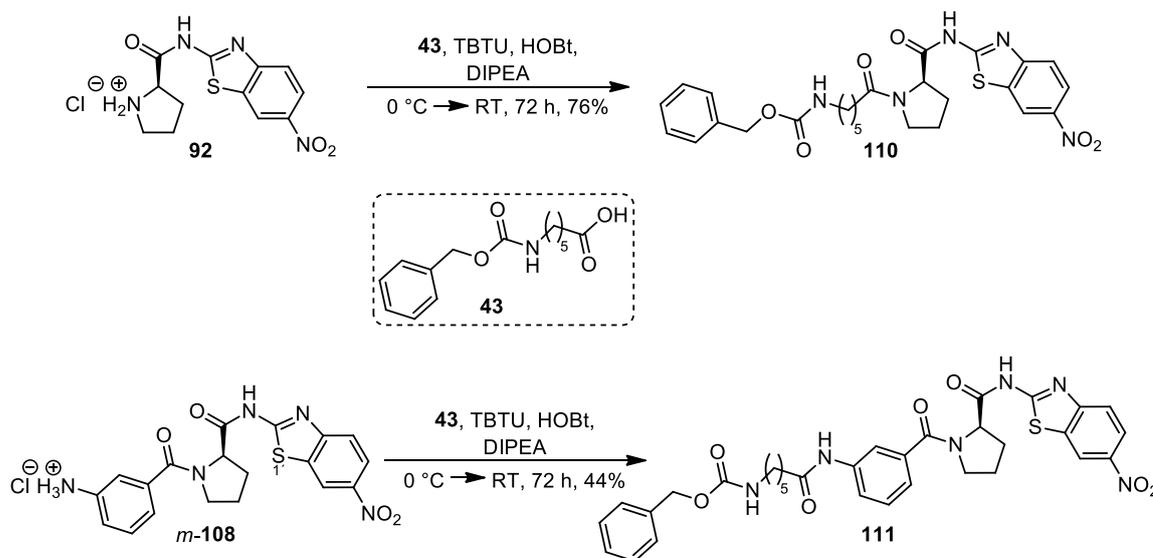


#	E	42 [Äq.]	TEA [Äq.]	DIPEA [Äq.]	LM	Zeit [h]	P [Ausbeute]
1	<i>m</i> - 108	1.0	2.0 ¹		DMF	92	<i>m</i> - 109 0%
2		1.0		9.5	DCM	92	54%
3		1.0		9.5	DCM	72	28%
4	<i>p</i> - 108	1.0	2.0 ¹		DMF	92	<i>p</i> - 109 0%
5		1.0	5.0		DCM	72	5%
6		1.0		9.5	DCM	72	28%

¹Nach 24 Stunden wurden erneut 2.00 Äq. hinzugegeben.

Nach 24 Stunden konnte kein Umsatz verzeichnet werden, sodass erneut TEA hinzugegeben wurde (insgesamt 4.0 Äq., **Tabelle 3.14**, #1 und #4). Nach 92 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen und das Gemisch säulenchromatographisch gereinigt. Die Zielverbindungen *m*-**109** und *p*-**109** konnten nicht isoliert werden. In einem erneuten Ansatz (**Tabelle 3.14**, #2) wurde für das Edukt *m*-**108** zum einem mehr NHS-Ester (1.3 Äq.) und zum anderen DIPEA, anstelle von TEA, im Überschuss eingesetzt. Als Lösemittel wurde DMF durch DCM ersetzt. Nach ebenfalls 92 Stunden konnte *m*-**109** als Rohprodukt mit einer Ausbeute von 54% gewonnen werden. Auch nach zweifacher säulenchromatographischer Reinigung enthielt das Produkt Verunreinigungen von rund 10% (UV-Signal LC-MS). Verbindung *p*-**109** konnte nach Änderung des Lösemittels von DMF zu DCM und Erhöhung der Basen-Äquivalente sowie Verringerung der Reaktionszeit auf 72 Stunden mit einer Ausbeute von 5% erhalten werden. Die Verunreinigungen betragen ca. 5% (UV-Signal LC-MS), sodass die Substanz in einem fluorimetrischen Assay untersucht werden konnte. Jedoch wurde mit weniger als 3.00 mg nur eine sehr geringe Substanzmenge erhalten. In einem weiteren Ansatz mit veränderten Bedingungen (**Tabelle 3.14**, Eintrag 6) wurde schließlich ausreichend Substanz hergestellt. Dies gelang ebenfalls für Verbindung *m*-**109**, sodass beide Produkte in einem fluorimetrischen Assay an der DENV2-NS2-NS3-Protease (vgl. Abschnitt 3.1.2.6) getestet werden konnten.

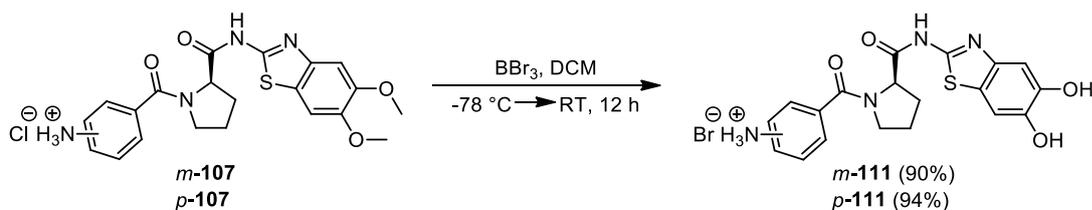
Im Rahmen des Forschungsmoduls von [REDACTED] wurde das 6-Nitrobenzo[*d*]thiazolderivat **92** mit dem Capronsäurederivat **43** mittels TBTU-Kupplung zur Testverbindung **110** umgesetzt. Parallel dazu wurde ausgehend vom *meta*-Aminobenzamidderivat *m*-**108** und Capronsäurederivat **43** die Testverbindungen **111** hergestellt. Beide Verbindungen konnten nach säulenchromatographischer Reinigung in moderaten Ausbeuten gewonnen werden (**Schema 3.17**).



Schema 3.17: Darstellung der Testverbindungen **110** und **111**.

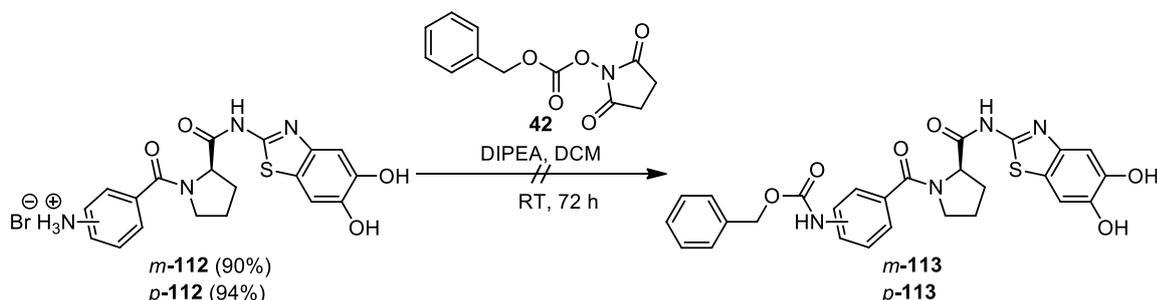
Die Auswertung und Diskussion der Daten des fluorimetrischen Assays sind in Abschnitt 3.1.2.6 zusammengefasst.

Da die 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Verbindungen grundsätzlich eine höhere Affinität zur NS2B-NS3-Protease haben, wurde zunächst versucht die Ammoniumsalze *m*-**107** und *p*-**107** mit dem NHS-Ester **42** umzusetzen. Um die Entfernung der Methylschutzgruppen mit Borontribromid in Gegenwart eines Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden, wurden die Methylether auf diesem Syntheseschritt gespalten. Beide Derivate konnte in hohen Ausbeuten gewonnen werden (**Schema 3.18**).



Schema 3.18: Darstellung der 5,6 Dihydroxybenzo[*d*]thiazolderivate *m*-111 und *p*-111 nach Entfernung der Methylschutzgruppe mit BBr_3 .

Die Umsetzung mit dem NHS-Ester **42** wurde analog zu den Reaktionen mit den oben vorgestellten Nitroverbindungen durchgeführt (**Schema 3.19**).



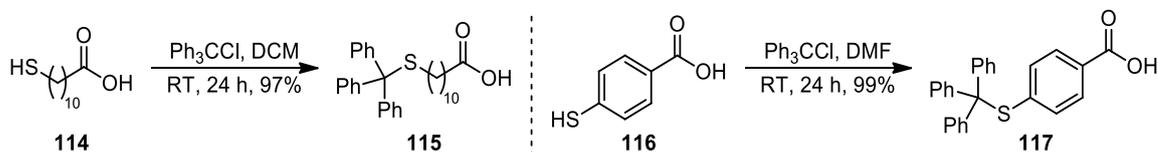
Schema 3.19: Versuch der Umsetzung des NHS-Esters **42** mit den Boroniumsalzen *m*-112 und *p*-112.

Die gewünschten Produkte (*m*-113 und *p*-113) konnten nicht isoliert werden. Da zu diesem Zeitpunkt bereits vielversprechendere Ergebnisse bei der Umsetzung von Thiolverbindungen (mit 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Gerüst) mit Maleimiden vorlagen, wurde von einer weiteren Optimierung abgesehen und es wurden die Nitroderivate (**110**, **111**, *m*-109 und *p*-109) als Testverbindungen verwendet.

Einführung von aromatischen und aliphatischen Thiolen für die Umsetzung mit Maleimiden

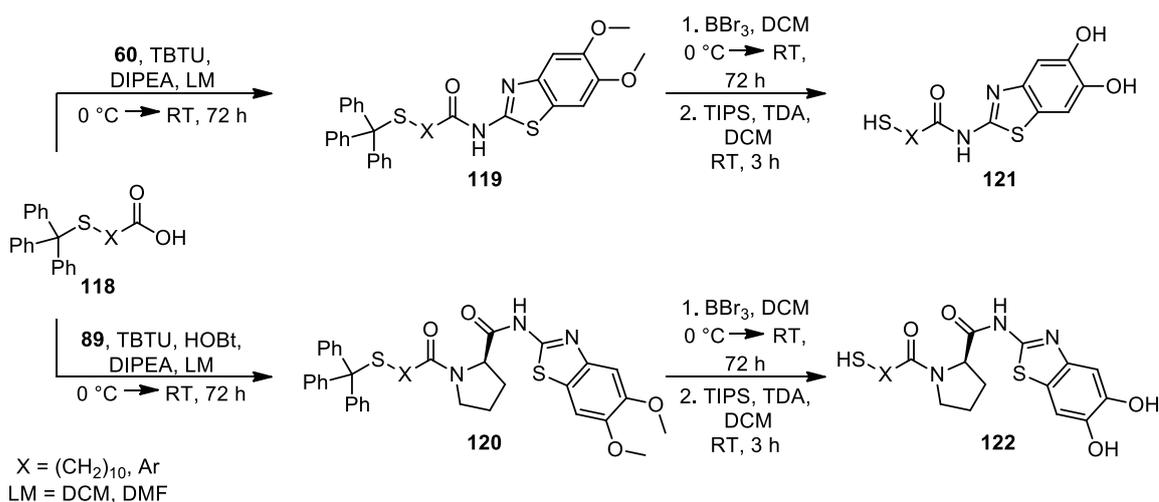
Die ebenfalls zu den „Click“-Reaktionen zählende Thiol-En-Reaktion zwischen einem Thiol und einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung findet nicht nur im Bereich der Biokonjugation breite Anwendung, sondern auch in der Polymersynthese und in der Synthese von Makromolekülen. Aufgrund der Thiolspezifität unter physiologischen Bedingungen und der Fähigkeit zur Ausbildung stabiler Thioether-Additionsprodukte werden Maleimide als α,β -ungesättigte Komponente beispielsweise als Cross-Linker für Hydrogele, als PEGylierungsreagenz oder als Linker für Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt.^[165-167] Dieser als Thiol-Michael-Addition bekannte Reaktionstyp sollte ebenfalls als Ansatz für die Modifizierung eines Inhibitors in Betracht gezogen werden.

Für die Einführung der Thiofunktionalität wurde zum einen *para*-Thiobenzoessäure (**116**) und zum anderen 11-Mercaptoundecansäure (**114**) im ersten Schritt mit einer Tritylschutzgruppe versehen (**Schema 3.20**).



Schema 3.20: Einführung einer Tritylschutzgruppe.

Beide Verbindungen (**115**, **117**) konnten in sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Anschließend sollten TBTU-Kupplungen mit dem 5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol-Derivat **60**, als auch mit dem Prolin/5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol-Derivate **89** durchgeführt werden. Die Entfernung der Methyl- und Tritylschutzgruppen sollte in zwei weiteren Schritten erfolgen (siehe **Schema 3.21**).



Schema 3.21: Darstellung der Thiolkomponenten.

Die durchgeführten TBTU-Kupplungen verliefen wie erwartet in moderaten bis guten Ausbeuten (**Abbildung 3.26**).

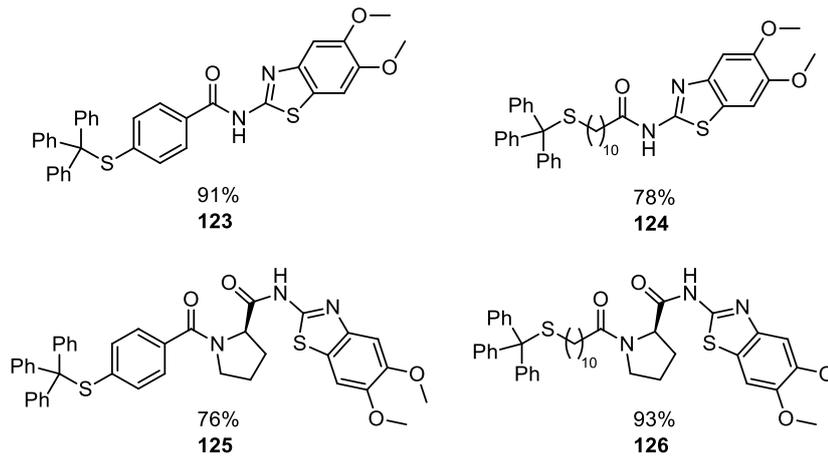


Abbildung 3.26: Ausbeuten der Verbindungen **123-126** nach TBTU-Kupplung.

Die Entfernung der Methylschutzgruppe mit Borontribromid verlief in diesen vier Fällen nur unzufriedenstellend. Anfänglich wurden pro Methoxygruppe zwei Äquivalente Borontribromid eingesetzt, was jedoch unvollständigen Umsatz zur Folge hatte. Anschließend wurden die Äquivalente verdoppelt. Die Reaktionskontrolle mittels LC-MS zeigte in allen Fällen eine erfolgreiche Entfernung der Methylether und ein potenzieller Produktpot konnte per Dünnschichtchromatographie detektiert werden. Angepasst an das Fließverhalten auf der DC-Platte in Cyclohexan/Ethylacetat (1:1 + 0.1% TFA) wurden die Rohprodukte säulenchromatographisch gereinigt. Hierbei konnten die Produkte jedoch nicht isoliert werden. Vermutlich kam es zu einer Zersetzung auf dem Säulenmaterial mit der Fließmittelzusammensetzung, die sich jedoch für ähnliche Verbindungen als geeignet erwiesen hat. Daraufhin wurde versucht die Rohprodukte mittels präparativer HPLC zu reinigen. Diese wurde testweise für Verbindung **128** durchgeführt. Das Rohprodukt lag in THF gelöst vor und das Produkt konnte mit 97% Reinheit mittels LC-MS isoliert werden. Jedoch betrug die Ausbeute lediglich 2%. Es wurde als mögliche Ursache angenommen, dass das Produkt im Fließmittelgemisch (ACN/H₂O 80:20) auf der Säule ausfiel. In einem weiteren Versuch wurde nochmals die säulenchromatographische Reinigung in Betracht gezogen, jedoch mit DCM/MeOH als Laufmittelgemisch. Nach zusätzlicher Anpassung der Borontribromid-Äquivalente führte dies schließlich zum Erfolg und die gewünschten Produkte konnten sehr guter Reinheit isoliert werden (**Abbildung 3.27**).

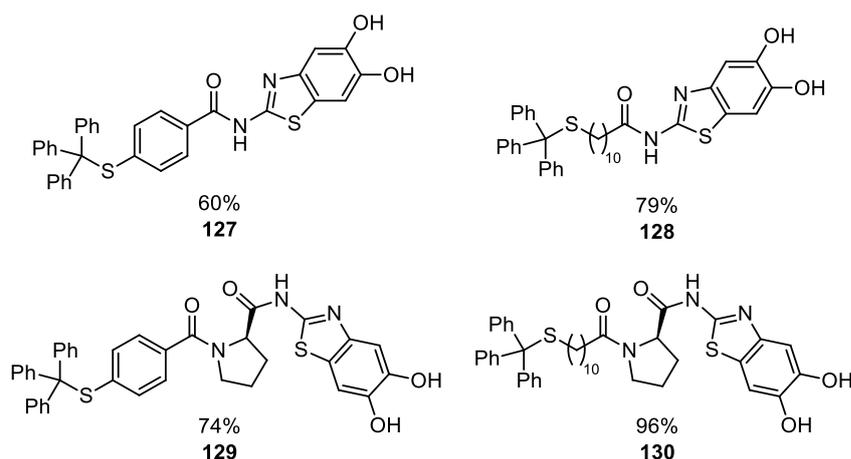


Abbildung 3.27: Derivate **127-130** nach Entfernung der Methylschutzgruppe mit BBr_3 .

Die Entfernung der Tritylschutzgruppe mit Isopropylsilan und Trifluoressigsäure verlief für die aliphatischen Verbindungen **132** und **134** in moderaten Ausbeuten (**Abbildung 3.28**). Die Verunreinigungen nach säulenchromatographischen Reinigung betrugen unter 5%, sodass diese Verbindungen (**132** und **134**) in einem fluorimetrischen Assay getestet werden konnten (vgl. Abschnitt 3.1.2.6). Bei den aromatischen Thiolen gelang es nicht, diese Reinheit zu erzielen. Bei Verbindung **131** handelt es sich bei der Verunreinigung um ein Disulfid. Die Verbindung **133** konnte hingegen nicht synthetisiert werden. Es wurde ausschließlich das Disulfid von Verbindung **133** isoliert (**Abbildung 3.28**).

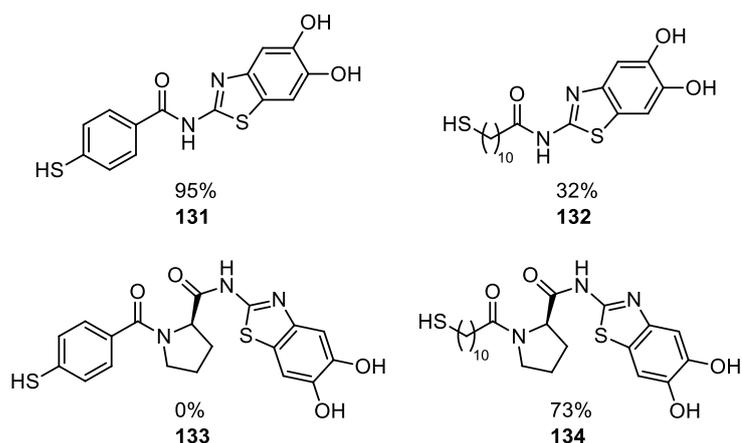
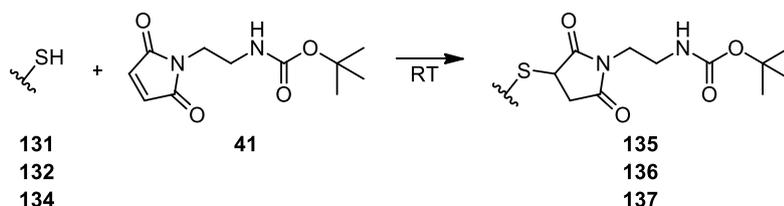


Abbildung 3.28: Thiolderivate nach Entfernung der Tritylschutzgruppe.

Da drei potenzielle Derivate für die Umsetzung mit einem Fluoreszenzfarbstoff hergestellt werden konnten, wurde auf eine weitere Optimierung an dieser Stelle verzichtet.

In Vorbereitung auf die Fluoreszenzmarkierung wurden die Verbindungen **131**, **132** und **134** mit dem Maleimid **41** in Anlehnung an KALIA *et al.*^[166] umgesetzt und der Reaktionsverlauf mittels LC-MS verfolgt. Die Edukte für die Thiol-En-Reaktion wurden jeweils im Äquivalentenverhältnis 1:1 eingesetzt. Die weiteren Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 3.15** zusammengefasst.

Tabelle 3.15: Reaktionsbedingungen für Thiol-Maleimid-Umsetzungen.



#	E	P	LM	TEA (mol%)	DIPEA (mol%)	Resultat
1	134	135	DMF	10	-	nicht isoliert
2			DMF	20	-	nicht isoliert
3			DMSO	10	-	nicht isoliert
4			DMSO	20	-	nicht isoliert
4	132	136	DMF	10	-	12% Ausbeute
5			DMF	-	10	nicht isoliert
6			DMF	20	-	nicht isoliert
7			DMF	-	20	nicht isoliert
8	131	137	DMF	10	-	11% Ausbeute

Die Reaktionskontrolle erfolgte jeweils nach einer Stunde, über Nacht (ca. 16 Stunden) und nach einer Woche. Jeder Ansatz führte zur Ausbildung des gewünschten Produktes, welches per LC-MS nachgewiesen wurde. Die Reaktionszeit über eine Woche führte nicht zu einem erhöhten Umsatz der Edukte. Es kam teilweise zur Ausbildung von Disulfiden als Nebenprodukte, sodass auch Reaktionszeiten von mehr als 16 Stunden nicht zu einer Verbesserung führen. Verbindung **135** konnte nicht mittels präparativer HPLC isoliert werden. Verbindung **137** enthielt Verunreinigungen von ca. 14% und die Ausbeute betrug rund 11%. Für Verbindung **136** wurde ebenfalls nur eine geringe Ausbeute von 12% erzielt, aber mit Verunreinigungen unter 5%, sodass diese in einem fluorimetrischen Assay untersucht werden konnte (vgl. Abschnitt 3.1.2.6). Der Produktverlust auf der zur Verfügung stehenden präparativen HPLC ist sehr hoch. Diese eignet sich daher nicht für die Reinigung der geringen Substanzmengen, die sich aus den im Mikromaßstab durchgeführten Reaktionsansätzen (< 20 mg) ergeben. Für die Umsetzung mit den Fluoreszenzfarbstoffen sollten

geringere Substanzmengen verwendet werden, sodass hier eine alternative Methode zur Isolierung des Produktes etabliert werden musste (siehe Abschnitt 3.1.2.7).

3.1.2.6 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Mit dem Ziel einen potenziellen nicht-kompetitiven Inhibitor mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren, wurden in der vorliegenden Arbeit diverse Ansätze parallel verfolgt. Zunächst wurden ausgehend von der damalige Leitstruktur **8** und weiteren Inhibitoren (**35–37**) verschiedene Synthesestrategien entwickelt. Charakteristisch für diese Substanzen ist die 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Stuktur (**Abbildung 3.29**, grün), die über eine (Thio)Salicylsäure (**Abbildung 3.29**, schwarz) an einen aromatischen oder aliphatischen Baustein (**Abbildung 3.29**, rot (R)) verknüpft ist.

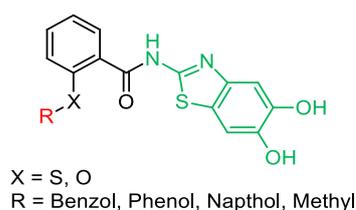


Abbildung 3.29: Grundgerüst der nicht-kompetitiven Inhibitoren.

Das 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Gerüst ist dabei entscheidend für die Affinität zur NS2B-NS3-Protease, sodass Modifizierungen nur am Rest „R“ oder dem direkt daran verknüpften Aromaten durchgeführt werden können. Die Derivatisierung der Verbindungen **35** bzw. **36** war dabei erfolgreich zur Testsubstanz **71**, welche auch im fluorimetrischen Assay gute Ergebnisse ($IC_{50} = 7.27 \mu M$, vgl. **Tabelle 3.16**) zeigte.

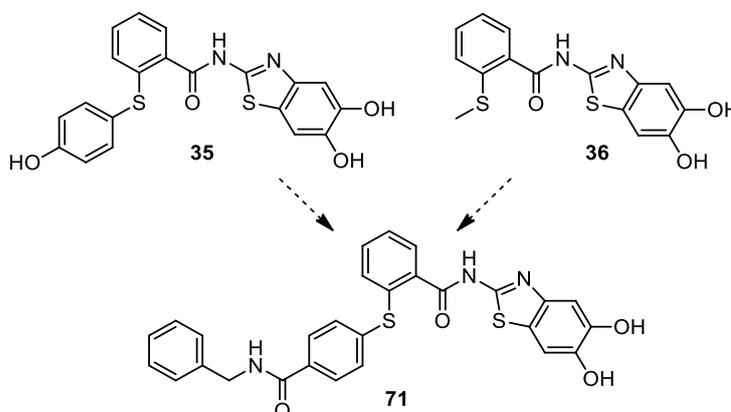


Abbildung 3.30: Basierend auf den Inhibitoren **35** und **36** hergestellte Testsubstanz **71**.

Der Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von ATTO 647N war jedoch so stark, dass sich das Derivat **71** ebenso wie die Leitstruktur **8** sich nicht als geeignete Verbindungen für fluorimetrische Untersuchungen erwiesen. Infolgedessen wurde die Derivatisierung der Strukturen **8** und **37** eingestellt.

Anhand dieser Erkenntnisse wurden basierend auf der neuen Leitstruktur **80** andere Synthesestrategien entwickelt. Zusätzlich wurden neben den 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Derivaten auch die 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Derivate beachtet, da bei diesen die Abspaltung der Methylether durch Borontribromid entfällt. Nachteilig bei diesen Verbindungen sind jedoch die allgemein schlechteren IC₅₀-Werte (**Tabelle 3.16**). Da zu Beginn der Arbeit unklar war, ob eine 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Verbindung erfolgreich mit einer Modellsubstanz umgesetzt werden kann, wurden alternativ die 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Verbindungen hergestellt.

Tabelle 3.16: Ergebnisse des fluorimetrischen Assays an der DENV2-NS2B-NS3-Protease der in Vorbereitung auf die Fluoreszenzmarkierung hergestellten Testsubstanzen. Angegeben sind IC_{50} -Werte oder die prozentuale Hemmung bei einer InhibitorKonzentration von 20 μM .

Verbindung	Formel	IC_{50} [μM]/%
71		7.27 ± 0.25
96		30%
110		59.19 ± 4.68
111		44.71 ± 2.74
<i>m</i> -109		53.52 ± 4.53
<i>p</i> -109		59.61 ± 8.23
132		15.26 ± 2.59
134		15.66 ± 1.77
136 ¹		5.26 ± 0.30

¹Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte nur eine Doppelbestimmung durchgeführt werden.

Aus **Tabelle 3.16** ist die erwartete schlechtere Hemmung der DENV2-NS2B-NS3-Protease durch die 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Verbindungen (IC_{50} -Werte zwischen 45 und 60 μM) abzulesen. Allerdings konnten einerseits Aminderivate erfolgreich in TBTU-Kupplungen als auch über NHS-Ester mit den Modellsustanzen umgesetzt werden (**110**, **111**, *m-109*, *p-109*). Darüber hinaus ist es gelungen das Derivat **95** mit freier Carboxygruppe ebenfalls in einer TBTU-Kupplung zur Verbindung **96** umzusetzen. Im Vergleich war es jedoch nicht erfolgreich, die analogen 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Derivate mit NHS-Estern umzusetzen. Ursächlich hierfür könnten die langen Reaktionszeiten von rund 72 Stunden in Gegenwart eines großen Überschusses von DIPEA sein. Es ist bekannt, dass die Catecholstruktur^p im basischen Milieu zur Oxidation neigt und somit die erforderlichen Reaktionsbedingungen nicht geeignet sind. Um das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe bei der Umsetzung zu vermeiden, sollte zusätzlich lange Reaktionszeiten vermieden werden, weshalb diese Reaktionsbedingungen nicht optimal sind. Es wurde daher schwerpunktmäßig die vielversprechendere Verbindungsklasse der Thiole untersucht. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen sowie der Isolierungsmethode konnten die Vorstufen (**127–130**) nach Entfernung der Methylether mit Borontribromid in ausreichend hohen Ausbeuten hergestellt werden. Die anschließende Abspaltung der Tritylschutzgruppe durch Trimethylsilan und Trifluoressigsäure lieferte die erforderlichen Thiolderivate. Zwei dieser Verbindungen (**132** und **134**) zeigten trotz der längeren, flexiblen Alkylkette gute Hemmeigenschaften an der DENV2-NS2B-NS3-Protease (**Tabelle 3.16**). Die Umsetzung mit der Modellsustanz **41** führte ebenfalls zum Erfolg. Problematisch war hierbei die Aufarbeitung mittels HPLC, welche zu großen Produktverlusten führte und nicht in jedem Fall die erforderliche Reinheit erzeugte. Daher wurde diese Methode für die Isolierung einer mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Substanzen ausgeschlossen und stattdessen präparative Dünnschichtchromatographie genutzt (siehe Abschnitt 3.1.2.7). Des Weiteren liegt der IC_{50} -Wert der Verbindung **136** mit rund 5 μM (**Tabelle 3.16**) in einem akzeptablen Bereich, was den Erwartungen für 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Derivaten entspricht.

^p Vergleich Dissertation von [REDACTED],^[136]

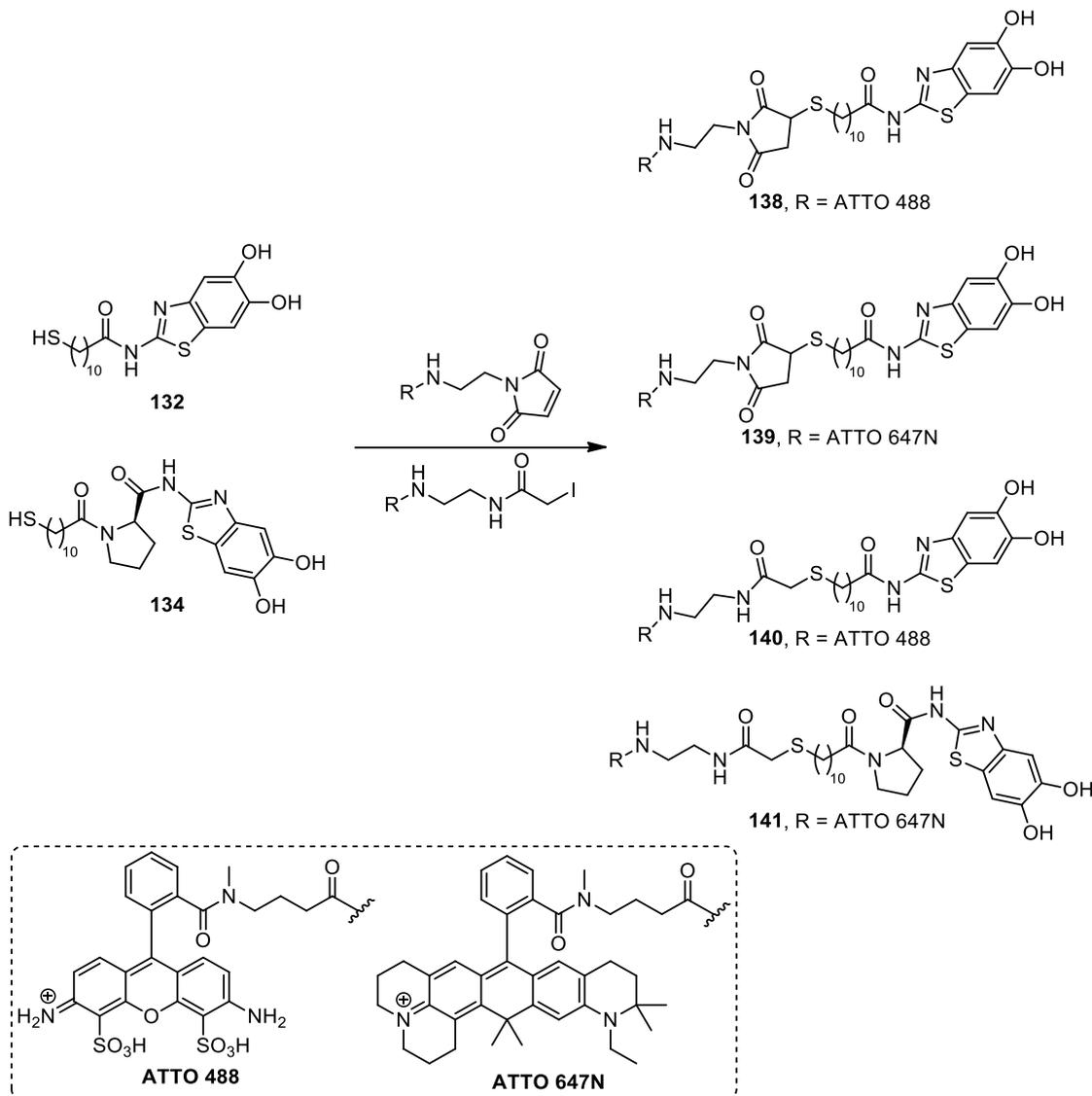
3.1.2.7 Fluoreszenzmarkierung Thiol-funktionalisierter Inhibitoren

Die Testansätze (vgl. Abschnitt 3.1.2.5) mit einem Maleimid (**41**) als Modellverbindung verdeutlichen, dass sowohl DMF und DMSO als Lösemittel sowie TEA und DIPEA als Basen für die Umsetzung eines Thiols mit dem Maleimid **41** geeignet sind. Für die Einführung des Fluoreszenzfarbstoffes wurden DMF und TEA als Reagenzien eingesetzt. Die Base wurde in einem wesentlich größeren Überschuss verwendet, da bei diesen Mikroansätzen ein 10–20%iger molarer Überschuss nicht abmessbar gewesen wäre ($< 0.03 \mu\text{L}$). Unabhängig von den Edukten wurden immer konstant $0.5 \mu\text{L}$ TEA der Reaktion zugeführt. **Tabelle 3.17** fasst die erste Versuchsreihe mit Maleimid- und Iodacetamid-Fluoreszenzfarbstoffen zusammen. Die Iodacetamid-Derivate waren aufgrund der Farbstoffmarkierung der NS2B-NS3-Protease verfügbar und wurden daher mit getestet.

Tabelle 3.17: Reaktionsansätze mit verschiedenen Farbstoffderivaten.

P	Edukt		Maleimid		Iodacetamid		TEA	Umsatz
	132	134	ATTO 488	ATTO 647N	ATTO 488	ATTO 647N		
138	2.0		1.0				7.6	nahezu vollst.
139	2.0			1.0			6.2	nahezu vollst.
140	1.0				1.0		8.1	unvollst.
141		1.0				1.0	8.6	unvollst.

Für die Edukte sind die Äquivalente angegeben. Lösemittel waren jeweils 0.5 mL DMF.



Schema 3.22: Fluoreszenzmarkierung der Inhibitoren **132** und **134** mit ATTO 488 und ATTO 647N.

Die Reaktionsverläufe wurden mittels LC-MS nach 15, 39 und 63 Stunden untersucht. Die Reaktionen des Inhibitors **132** mit den Maleimid-Derivaten von ATTO 488 und ATTO 647N zeigten bereits nach 15 Stunden einen nahezu vollständigen Umsatz zu den gewünschten Produkten **138** und **139** (**Schema 3.22**). Die Reaktionen mit den Iodacetamid-Farbstoffen führten hingegen zu einem Produktgemisch und der vollständige Verbrauch der Edukte konnte auch durch eine verlängerte Reaktionsdauer über drei Tage nicht erreicht werden. Die Isolierung der Produkte sollte über präparative Dünnschichtchromatographie erfolgen. Die Trennbedingungen wurden mit Kieselgel beschichteten Aluminiumplatten (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ und ALUGRAM® RP-18W/UV₂₅₄) evaluiert. Für die vergleichsweise unpolaren Verbindungen **139** und **141** eignete sich als Fließmittel DCM/MeOH (19:1) auf einer

ALUGRAM® Xtra-DC-Platte. Die Trennung der Produktflecken durch präparative Dünnschichtchromatographie war hingegen im getesteten Laufmittel nicht ausreichend. Die Substanzflecken wurden getrennt und das Kieselgel von der Glasplatte gelöst. Es ist mit verschiedenen Lösemitteln (DMSO, DMF, ACN, DCM) nicht gelungen, die Produkte aus dem Kieselgel zu isolieren. Verbindungen **138** und **140** ließen sich hingegen mit ACN/H₂O (30:70) auf *Reversed-Phase*-Platten (mit C-18 modifizierte Kieselgel-Platten) trennen und zeigten auch auf den Platten für präparative Dünnschichtchromatographie ein verbessertes Trennverhalten. Das Produkt wurde erfolgreich mit einer Ausbeute von 37% in einem Gemisch aus ACN/H₂O (70:30) von der stationären Phase extrahiert (siehe **Tabelle 3.18**, #1). Für die Testung in einem fluorimetrischen Assay und für einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen wurde in mehreren kleinen Ansätzen gemäß **Tabelle 3.18** das markierte Produkt hergestellt.

Tabelle 3.18: Ansätze für den markierten Inhibitor **138**.

#	132 [mg] (Äq.)	ATTO 488 [mg] (Äq.)	TEA (Äq.)	Ausbeute [mg] (%)
1	0.36 (2.0)	0.50 (1.0)	7.7	0.23 (37)
2	0.37 (2.1)	0.50 (1.0)	7.7	0.15 (30)
3	0.43 (2.0)	0.61 (1.0)	6.4	0.24 (38)
4	0.98 (2.4)	1.14 (1.0)	6.8	0.50 (34)

Beim Extrahieren des Produktes von der RP-Kieselgel-Platte wurden bei den Ansätzen #3 und #4 zusätzliche Waschschrte eingeführt. Es wurde über einen längeren Zeitraum das RP-Kieselgel-Gemisch im Lösemittel gerührt, was jedoch die Ausbeuten nicht verbesserte. Der markierte Inhibitor **138** wurde anschließend im fluorimetrischen Assay an der DENV2-NS2B-NS3-Protease getestet. Um auszuschließen, dass der Farbstoff ATTO 488 die Hemmung oder den fluorimetrischen Assay beeinflusst, wurden dieser, sowie ATTO 647N, vorab untersucht. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden wie die Proteaseinhibitoren in Konzentrationen von 20 µM eingesetzt und es wurde eine Doppelbestimmung an der DENV2-NS2B-NS3-Protease durchgeführt (vgl. Abschnitt 8.2). ATTO 488 zeigte eine potenzielle Hemmung von ca. 53% und ATTO 647N von 9%. Ob es sich dabei um eine tatsächliche Hemmung der Protease handelt, wurde in einer zusätzlichen Messung ohne Protease eruiert. Hierfür wurde der reine Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) ohne Substrat (Boc-Gly-Arg-Arg) und ohne Protease in An- und Abwesenheit der entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe ATTO 488 und

ATTO 647N vermessen. Ist die detektierte Fluoreszenz der zu untersuchenden Verbindung niedriger als die von AMC, zeigt dies den Einfluss auf die Fluoreszenz von AMC und erfordert eine Bestimmung des Korrekturfaktors.

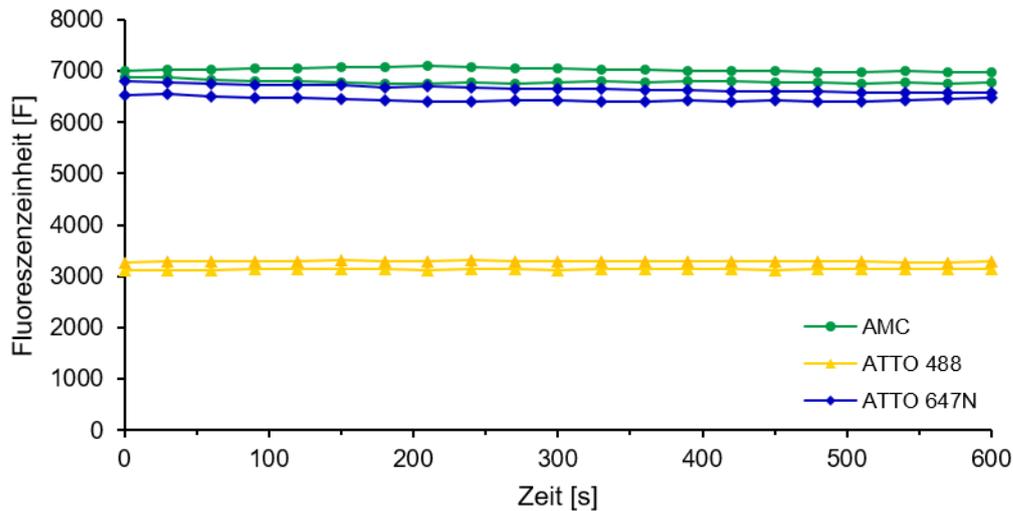


Abbildung 3.31: Einfluss der Farbstoffe auf den Fluoreszenzfarbstoff AMC. AMC+DMSO (grün, Kontrolle), AMC+ATTO 488 (gelb), AMC+ATTO 647N (blau).

Abbildung 3.31 zeigt eine deutliche Verringerung der Fluoreszenz durch ATTO 488 (gelb) auf ungefähr die Hälfte der Fluoreszenzeinheiten. ATTO 647N (blau) hat hingegen nur einen leichten Einfluss auf die Fluoreszenz von AMC. Für beide Farbstoffe wurde der Korrekturfaktor nach der Formel **8.3** (Abschnitt 8.3) berechnet. Unter Berücksichtigung des Faktors ergibt sich für ATTO 488 (Faktor = 0.47) eine tatsächliche Hemmung von unter 1% (nicht-korrigiert 53%) und für ATTO 647N (Faktor = 0.93) von rund 2% (nicht-korrigiert 9%). Für Verbindung **138** muss somit ebenfalls der Korrekturfaktor bestimmt werden. Dieser beträgt 0.48, sodass die effektive Hemmung bei 20 μM InhibitorKonzentration rund 24% beträgt. Der IC_{50} -Wert konnte aufgrund der sehr geringen Substanzmenge von Verbindung **138** nur mit Konzentrationen bis 150 μM ermittelt werden, wobei anhand der geringen Hemmung höhere Konzentrationen erforderlich gewesen wären. Unter Einbezug des Korrekturfaktors erwiesen sich die Konzentrationen kleiner 10 μM als nicht aussagekräftig, da diese zu einer „Restenzymaktivität“ von über 100% führten. Der IC_{50} -Wert von $41.5 \pm 3.77 \mu\text{M}$ wurde mit den Konzentration 10, 50, 100 und 150 μM ermittelt. Daher kann dies nur ein Richtwert sein, welcher in dem Größenbereich bei einer 20%igen Hemmung vermutlich noch etwas höher ausfallen würde. Für einen

exakten Wert wären mehr Datenpunkte bei größeren Konzentrationen erforderlich. XXXXXXXXXX führte mit dem markierten Inhibitor **138** sowie mit dem reinen ATTO 488 vor und nach Zugabe der WT-Protease FCS-Experimente durch. Dabei stellte sich heraus, dass in den notwendigen Konzentrationsbereich der freie Farbstoff ähnliche Wechselwirkungen mit der WT-Protease zeigt, wie der markierte Inhibitor. Es besteht somit die Möglichkeit, dass der markierte Inhibitor über den Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch an die Protease bindet. Dadurch können mögliche Veränderungen der Protease nicht eindeutig der Inhibitor-Protease-Wechselwirkung über nicht-kompetitive Hemmung zugeschrieben werden. Da es sich um einen ionisch geladenen Farbstoff handelt, sind Wechselwirkungen mit den Aminosäuren in den Seitenketten der Protease sehr wahrscheinlich. Es ist daher entscheidend, einen Inhibitor mit einem besseren IC_{50} -Wert, also einer effektiveren Inhibition, zu entwickeln, damit unspezifische Wechselwirkungen mit der Protease vernachlässigbar werden. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für den verhältnismäßig schlechten IC_{50} -Wert der Verbindung **138** im Vergleich zur unmarkierten Vorstufe **132** ($15.3 \pm 2.59 \mu\text{M}$) sowie zur Testverbindung **136** ($5.26 \pm 0.30 \mu\text{M}$), welche eine deutlich bessere Hemmung zeigen (vgl. Kapitel 3.1.2.6). Durch eine mögliche Haftung an der Proteinoberfläche gelangt der Inhibitor gegebenenfalls nicht in die allosterische Bindetasche und kann seine Wirkung nicht entfalten. Da sich ATTO 647N aufgrund der mäßigen Hydrophilie weder gut von den DC-Platten ablösen lässt und auch bei der Markierung der Proteasen wesentlich ausgeprägtere Wechselwirkungen zeigte, eignet sich dieser nicht als alternativer Fluoreszenzfarbstoff zu ATTO 488. Hingegen wurde der hydrophilere Akzeptorfarbstoff Cy5 für weitere Markierungen der Inhibitoren **131**, **132**, **134** (**Abbildung 3.32**) verwendet.⁹

⁹ XXXXXXXXXX synthetisierte im Rahmen ihrer Doktorarbeit die Cy5-Inhibitoren und untersuchte den freien Fluoreszenzfarbstoff Cy5 im fluorimetrischen Assay. Das Screening der Inhibitoren wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

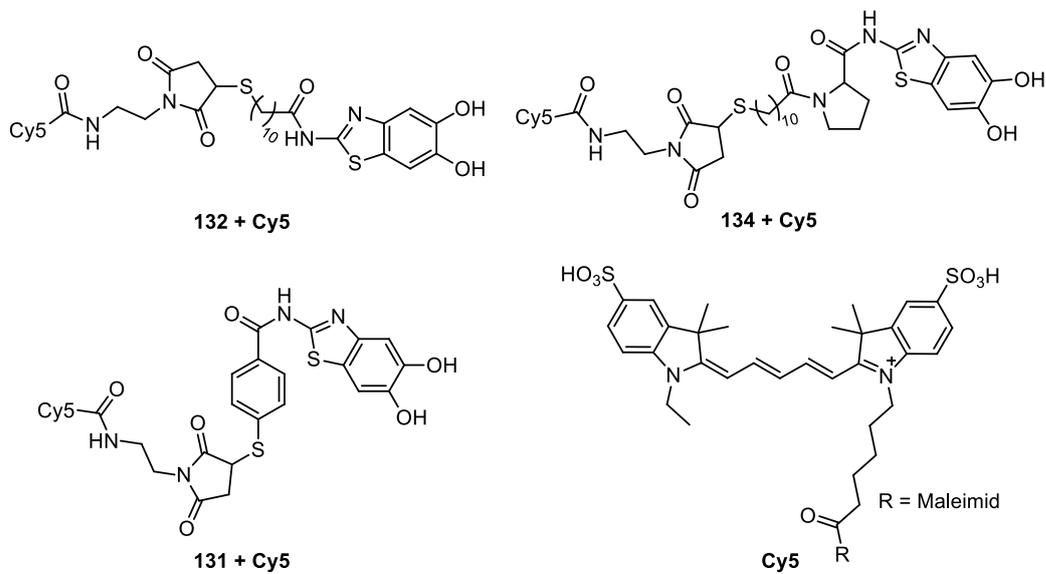


Abbildung 3.32: Neue markierte Inhibitoren nach Umsetzung der Strukturen **131**, **132**, **134** mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5.

Ein erstes Screening der neuen Verbindungen im fluorimetrischen Assay bei ca. $20 \mu\text{M}$, zeigte eine deutlich bessere Hemmung der DENV2-NS2B-NS3-Protease im Vergleich zu **138** (**Abbildung 3.33**). Weiterhin hat Cy5 einen geringen Einfluss auf die Fluoreszenz des AMC-Farbstoffs (Korrekturfaktor = 0.89), sodass eine Bestimmung des IC_{50} -Wertes erleichtert ist. Für die Berechnung der prozentuale Hemmung wurde für die neuen Inhibitoren der Korrekturfaktor des freien Cy5 einbezogen. Der Korrekturfaktor muss noch für jede einzelne Verbindung bestimmt werden, um den genauen IC_{50} -Wert bestimmen zu können. Dieser sollte aber in einem ähnlichen Größenbereich liegen, wie beim freien Fluoreszenzfarbstoff Cy5.

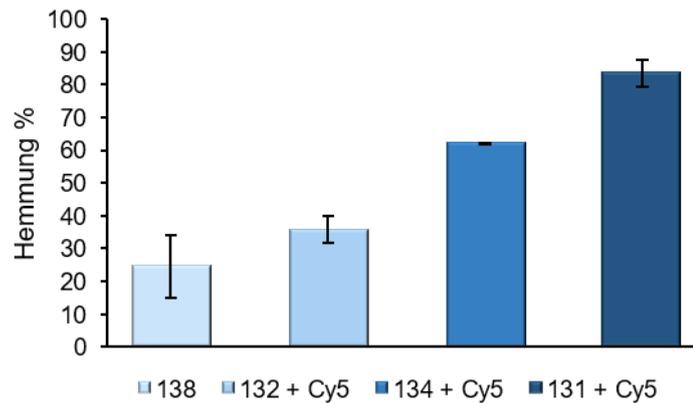


Abbildung 3.33: Vergleich der prozentualen Hemmung der DENV2-NS2B-NS3-Protease durch die markierten Inhibitoren (**138** (~ 24%), **132** + Cy5 (~ 36%), **134** + Cy5 (~ 62%), **131** + Cy5 (~ 84%). Die Hemmung wurde unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors für Verbindung **138** bzw. freies Cy5 aus einer Doppelbestimmung berechnet.

Hierfür muss jedoch zuerst eine größere Menge der Cy5-markierten Inhibitoren synthetisiert und untersucht werden. Weiterhin wurde von [REDACTED] freies Cy5 bei 20 und 100 μM getestet, wobei bei der Standardkonzentration (20 μM) keine Hemmung verzeichnet wurde, bei 100 μM diese jedoch bei rund 60% liegt. Dies zeigt erneut, wie entscheidend unspezifische Wechselwirkungen des Fluoreszenzfarbstoffes mit der Protease sind und dass der IC_{50} -Wert eines Inhibitors möglichst niedrig sein muss. Dadurch kann dieser in entsprechend geringer Konzentration eingesetzt werden, bei denen unspezifische Wechselwirkungen vernachlässigbar werden.

3.2 Photoaffinitätsmarkierung (PAL)

Für die Optimierung neuer nicht-kompetitiver Inhibitoren ist es von entscheidendem Vorteil, wenn der genaue Bindemodus bzw. die Bindestelle eines Hits oder einer Leitstruktur bekannt und experimentell bewiesen ist. Besonders aufschlussreich sind dabei Kristallstrukturen, bei denen ein Inhibitor kokristallisiert wurde. Sehr häufig gelingt dies jedoch nur mit kompetitiven Inhibitoren oder es werden Kristallstrukturen ohne Liganden erhalten. Im Falle der DENV2-NS2B-NS3-Protease existieren diverse Kristallstrukturen (Bsp. PDB: 3U1I, 3U1J, 2FOM), aber keine eindeutige mit einem nicht-kompetitiven Inhibitor (vgl. Abschnitt 1.1.3.3). Die potenzielle allosterische Bindetasche der Protease wurde anhand von Docking-Experimenten charakterisiert.^[66] Erste experimentelle Beweise für die Bindung nicht-kompetitiver Inhibitoren in diese allosterische Bindetasche lieferten MILLIES *et al.*^[45] durch Einführung von Mutationen in diese Bindetasche, wodurch es zum Verlust der Inhibitionskraft bekannter Strukturen kam. Eine weitere Möglichkeit diese Bindung zu spezifizieren, stellt die Photoaffinitätsmarkierung dar, bei der ein Inhibitor mit einer photoreaktiven Gruppe versehen wird. Diese kann im Verlauf der Photolyse mit umliegenden Aminosäuren der allosterischen Tasche kovalent reagieren und Aufschluss über den postulierten Bindemodus geben. In der Arbeitsgruppe SCHIRMEISTER wurden verschiedene nicht-kompetitive Inhibitoren der DENV2-Protease zudem an der verwandten Zikavirus-Protease getestet. Diese besitzt ebenfalls eine allosterische Tasche, welche in Docking-Studien eine ähnliche Affinität zu den nicht-kompetitiven Inhibitoren **8** und **30** zeigt (**Abbildung 3.34**).

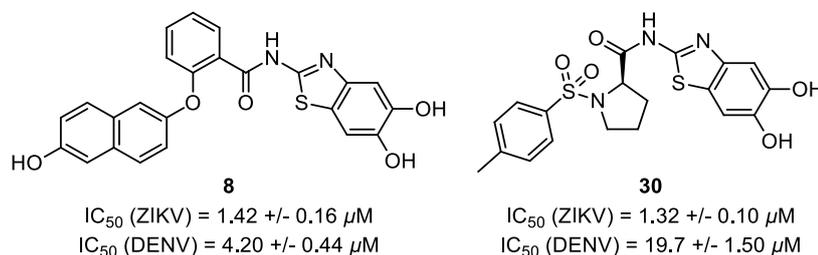


Abbildung 3.34: Nicht-kompetitive Inhibitoren **8** und **30**.^[45,66]

Im fluorimetrischen Assay and der ZIKV-Protease stellte sich weiterhin heraus, dass häufig eine stärkere Hemmung hervorgerufen wurde. Daher wurde für die Photoaffinitätsmarkierung auch die ZIKV-Protease untersucht, um Informationen für

das unterschiedliche Inhibitionsverhalten zu erhalten. Für dieses Nebenprojekt sollten verschiedene Strukturen synthetisiert werden, in welchen photoreaktive Benzophenon- oder Diaziringruppen, über TBTU-Kupplungen mit anschließender Entfernung der Methylschutzgruppen, eingeführt werden sollten (vgl. **Abbildung 3.35**).

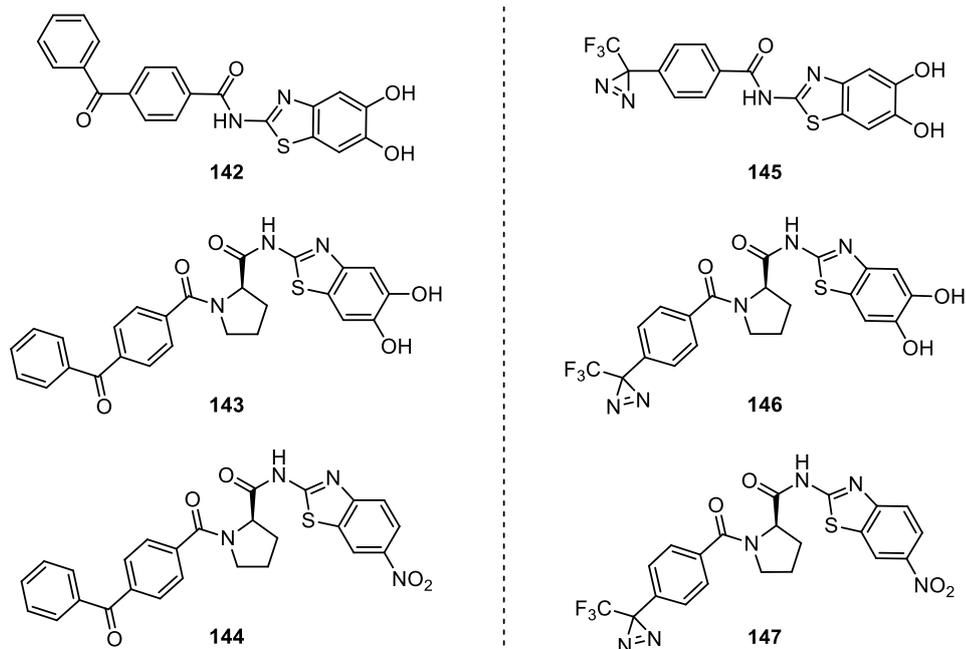


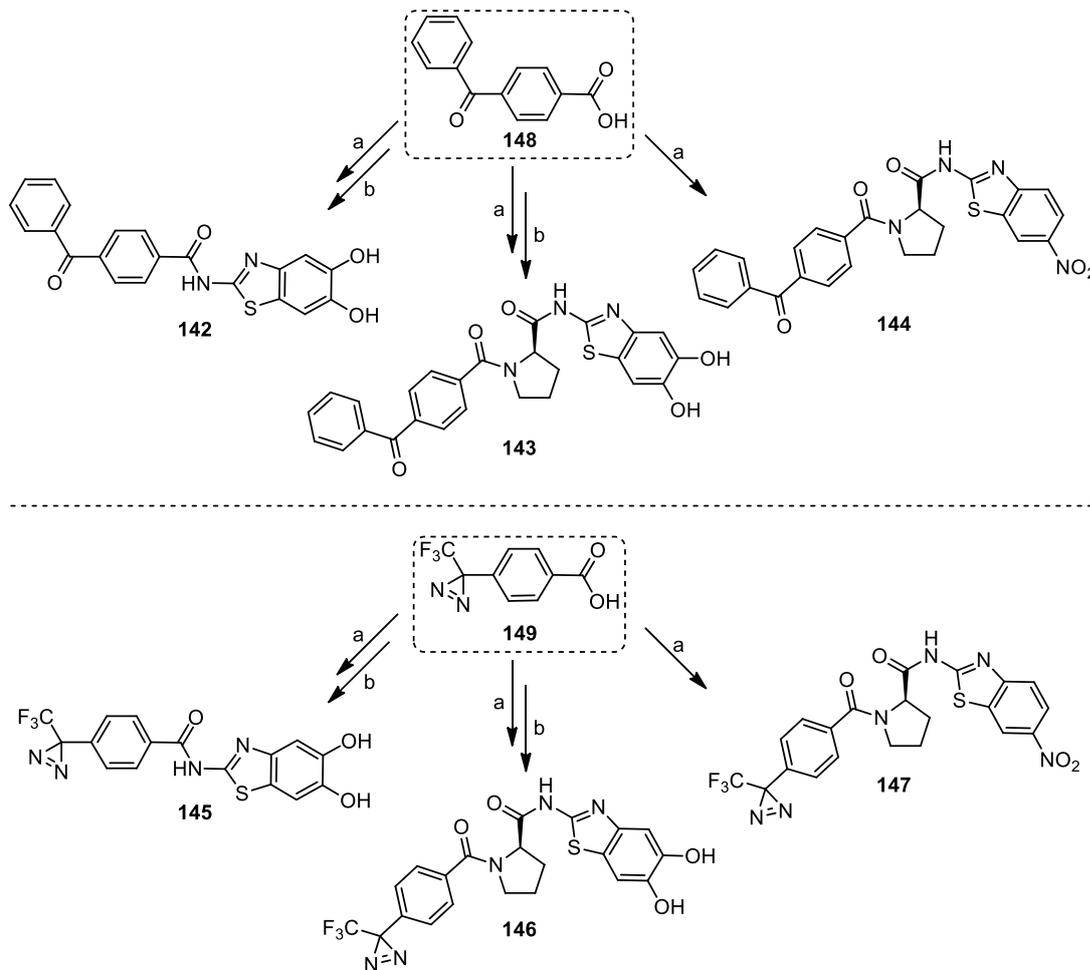
Abbildung 3.35: Potenzielle Inhibitoren mit photoreaktiven Benzophenon- (links) und Trifluormethyldiaziringruppen (rechts).

Anschließend sollten diese Verbindungen in einem fluorimetrischen Assay an den NS2B-NS3-Proteasen (DENV2, ZIKV) untersucht und das Verhalten durch Bestrahlung in Lösung (MeOH, Assay-Puffer) evaluiert werden (Kinetik/Zerfallsstudien^[91]). Im letzten Schritt sollten sowohl die DENV2 als auch die ZIKV-NS2B-NS3-Protease mit dem vielversprechendsten Inhibitor zusammen bestrahlt und massenspektrometrisch analysiert werden. Neben den klassischen 5,6-Dihydroxybenzo[d]-thiazol-Verbindungen sollten außerdem 6-Nitrobenzo[d]thiazol-Verbindungen synthetisiert werden, um die geringere Affinität zur Protease zu verdeutlichen und zu erklären.

3.2.1 Synthese der Inhibitoren mit photoreaktiver Gruppe

Die ausgewählten Verbindungen wurden im ersten Schritt durch TBTU-Kupplungen und im zweiten Schritt, wenn erforderlich, durch Entfernung der Methylschutzgruppe synthetisiert (**Tabelle 3.19**).

Tabelle 3.19: Synthetisierte Benzophenon- und Trifluormethyldiazirinderivate.



E	Bedingungen (a)	Zwischenprodukt	Bedingungen (b)	Produkt
60	TBTU, HOBT, DIPEA, EA	150 (88%)	BBr_3	142 (96%)
89	TBTU, HOBT, DIPEA, DMF	151 (55%)	BBr_3	143 (97%)
92	TBTU, DIPEA, DMF	/	/	144 (45%)
60	TBTU, HOBT, DIPEA, DMF	152 (60%)	BBr_3	145 (97%)
89	TBTU, HOBT, DIPEA, DMF	153 (80%)	BBr_3	146 (99%)
92	TBTU, DIPEA, DMF	/	/	147 (56%)

Alle Reaktionen wurden soweit möglich unter Lichtausschluss durchgeführt und die gewünschten Produkte konnten in moderaten bis sehr guten Ausbeuten erhalten werden (**Tabelle 3.19**).

3.2.2 Testung der synthetisierten Inhibitoren mit photoreaktiver Gruppe

In einem fluorimetrischen Assay (vgl. Abschnitt 8.2) sollte anschließend überprüft werden, ob die synthetisierten Verbindungen **142–147** noch eine Affinität zu den NS2B-NS3-Proteasen aufweisen oder ob eine Inhibierung beispielsweise durch den raumfordernden Benzophenon-Rest eingeschränkt wird. Wie bereits erwähnt, sollte für dieses Projekt ebenfalls die ZIKV-Protease^r untersucht werden. Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden musste, war die Zusammensetzung des Assay-Puffers 1 (vgl. Abschnitt 7.1.1). Diesem sind standardmäßig 20% Glycerol zugesetzt, da es sich bei der NS2B-NS3-Protease ursprünglich um ein Membranprotein handelt, welches in seiner Sequenz soweit gekürzt wurde, dass nur die funktionsfähige NS2B-NS3-Protease eingesetzt wird.^[137] Glycerol ist jedoch ungeeignet für massenspektrometrische Untersuchungen, da einerseits hohe Intensitäten bei der Detektion verursacht werden, was den Nachweis geringer Konzentrationen modifizierter Proteine erschwert und andererseits Glycerol über die Säule schmiert. Aus diesem Grund mussten andere geeignete Pufferzusammensetzungen untersucht werden. Anstelle des Glycerols könnten Substanzen wie beispielsweise Saccharose oder Glucose als Stabilisatoren dem Puffer zugesetzt werden.^[168] Zunächst wurde geprüft, ob die NS2B-NS3-Proteasen (DENV, ZIKV) in einem Puffer ohne Glycerol und ohne weiteren Zusatz aktiv sind (**Abbildung 3.36**). Hierfür wurden jeweils zwei Doppelbestimmungen im Assay-Puffer mit und ohne Glycerol durchgeführt. Die Konzentrationen der Proteasen betragen für DENV 125 nM und für ZIKV 25 nM. **Abbildung 3.36** zeigt, dass es keinen wesentlichen Unterschied zwischen der Enzymaktivität der DENV-Protease im Puffersystem mit und ohne Glycerol gibt (ca. 3% Aktivitätsdifferenz). Die ZIKV-Protease weist hingegen mit einem Aktivitätsverlust von 10% eine etwas größere Differenz der Aktivität in den beiden Puffersystemen auf. Da es sich um einen fluorimetrischen Assay handelt, bei dem die Fluoreszenz direkt

^r Die ZIKV-Protease wurde von ██████████ zur Verfügung gestellt.

proportional zum Spaltprodukt AMC ist, sollte die verringerte Proteaseaktivität das Ergebnis des fluorimetrischen Assays nicht beeinflussen.

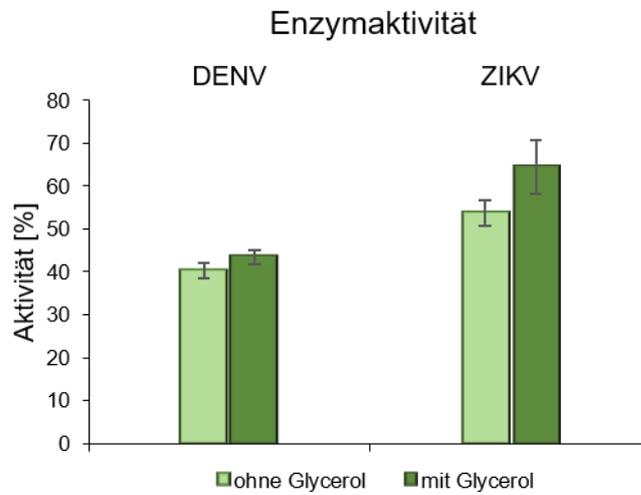
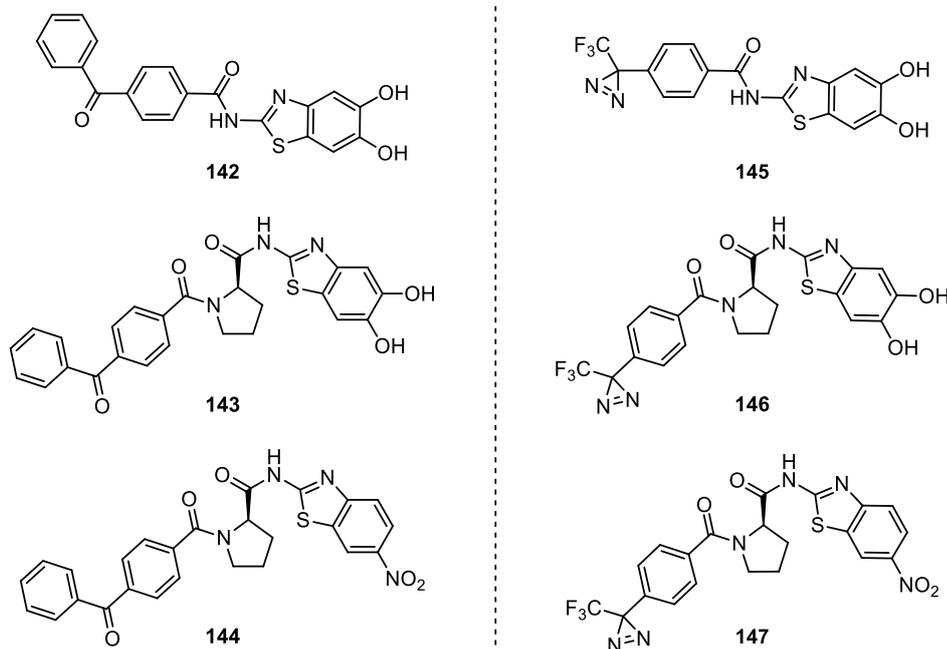


Abbildung 3.36: Vergleich der Enzymaktivität der DENV- und ZIKV-Protease im Assay-Puffer mit und ohne Glycerol.

Um weiterhin auszuschließen, dass das Puffersystem einen Einfluss auf die Inhibitionsfähigkeit der potenziellen Proteaseinhibitoren hat, wurden die IC_{50} -Werte der Verbindungen mit beiden Assay-Puffersystemen bestimmt (**Tabelle 3.20**).

Tabelle 3.20: IC₅₀-Werte der Benzophenon- und Trifluormethyldiazirinderivate mit und ohne Glycerol im Assay-Puffer.

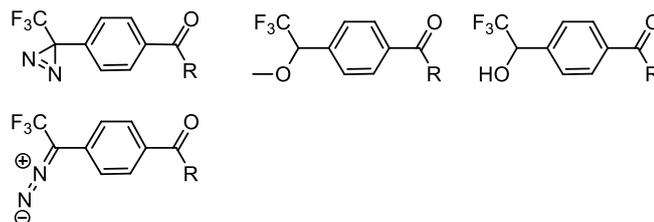


Verbindung	DENV IC ₅₀ [μM]		ZIKV IC ₅₀ [μM]	
	ohne Glycerol	mit Glycerol	ohne Glycerol	mit Glycerol
142	12.91 ± 1.04	22.91 ± 4.32	6.88 ± 0.33	10.14 ± 0.16
143	17.75 ± 1.29	32.45 ± 1.51	5.16 ± 0.86	12.74 ± 0.68
144	52.78 ± 13.66	42.50 ± 1.76	48.63 ± 7.57	65.50 ± 6.77
145	10.81 ± 0.58	12.94 ± 1.79	6.30 ± 0.29	11.17 ± 0.81
146	9.61 ± 0.83	22.59 ± 2.80	7.12 ± 0.75	9.58 ± 0.41
147	42.96 ± 6.99	48.56 ± 6.96	43.91 ± 4.74	44.19 ± 7.33

Die IC₅₀-Werte zeigen zum einen, dass die 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Verbindungen **144** und **147** wie erwartet eine geringere Affinität im Vergleich zu den 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Derivaten (**142**, **143**, **146**, **147**) aufweisen. Zum anderen binden die 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Verbindungen an die ZIKV-Protease mit einer höheren Affinität als an die DENV-Proteas. Weiterhin ist auffällig, dass die Proteasen von den 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Derivaten im Assay-Puffer ohne Glycerol tendenziell stärker inhibiert werden, was ebenfalls für die 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Verbindung **144** bei ZIKV zutrifft. Möglicherweise werden die Inhibitoren in der Bindung an die NS2B-NS3-Protease durch die Viskosität des Glycerols eingeschränkt. Für die 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Verbindung kann dies jedoch an der DENV-Protease nicht beobachtet werden, ebenso wie für **145** an DENV und **146** an ZIKV. Somit konnte kein eindeutiger Trend beobachtet werden und es wurde nicht geklärt, wodurch die Unterschiede verursacht werden.

3.2.3 Untersuchung der photochemischen Reaktivität

In Vorbereitung auf die Umsetzung und Bestrahlung einer dieser Substanzen (**142–147**) mit der NS2B-NS3-Protease sollten die Bedingungen für die Photoaktivierung der synthetisierten Verbindungen optimiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine *High-Power UV-LED smart* Lampe (Leistung 5 Watt) mit einer Wellenlänge von 365 nm verwendet. Eine optimale Bestrahlung kann über den Abstand zur Strahlenquelle oder die Intensität der Lampe reguliert werden. Benzophenone werden für gewöhnlich mit einer Wellenlänge von 350–360 nm aktiviert, während Diazirine hingegen über einen größeren Wellenlängenbereich von 350–380 nm aktiviert werden können.^[90] Um die NS2B-NS3-Proteasen während der Bestrahlung nicht bis zu einem möglichen Funktionsverlust zu schädigen, wurde eine Bestrahlungszeit von unter 30 Minuten angestrebt.^[93,107,169] Erste Versuche in Methanol als Lösemittel und einer InhibitorKonzentration von 1 mM bei einer Intensität von 100% mit Abständen von 2–5 cm führten zur vollständigen Zersetzung der Edukte ohne Ausbildung stabiler Addukte (**143** und **146**). Weiterhin bildeten die Benzophenone bei geringer Intensität (10%) und einem Abstand von 2 cm keine stabilen Addukte aus (**143**) oder es fand keine Photolyse statt (**144**). Verbindung **144** verdeutlicht dabei, dass Benzophenone eine längere Bestrahlungszeit benötigen, da hier nach 30 Minuten noch keine Photolyse zu verzeichnen war. Mit **146** konnte im Vergleich dazu bereits eine vollständige Photolyse nach ca. fünf Minuten erzielt werden und es bildeten sich stabile Addukte. Nach diesen ersten Erkenntnissen konzentrierten sich weitere Kinetikstudien auf die hergestellten Diazirinderivate, da diese kürzere Bestrahlungszeiten zur Aktivierung benötigen und stabilere Photoaddukte ausbilden. Um zunächst einen Überblick zu erhalten, wie schnell sich die Edukte umsetzten und welche Produkte sich in Methanol bilden, wurden im Sechsinutenintervall Proben entnommen und mittels HPLC-MS ausgewertet. Für die Verbindungen **145** und **146** erwies sich eine Bestrahlung mit 10% Lampenintensität (2 cm Abstand) und für Verbindung **147** eine Bestrahlung mit 30% Intensität (2 cm Abstand) als optimal. Alle drei Edukte zeigten ein vergleichbares Photolyseverhalten und führten zu den in **Tabelle 3.21** dargestellten Photoaddukten. Die Ausbildung der längerlebigen linearen Diazoverbindung stellt dabei eine unerwünschte Nebenreaktion dar, welche die Umsetzung zu den gewünschten stabilen Photoaddukten verlangsamt.

Tabelle 3.21: Addukte nach Photolyse der Diazirinderivate mit den analysierten Massen.

Verbindung	$[M + H]^+$	$[M - N_2 + MeOH + H]^+$	$[M - N_2 + H_2O + H]^+$
145	395.1	399.1	385.1
146	492.2	496.2	482.2
147	505.4	509.4	495.4

145 zersetzte sich nach rund 20 Minuten vollständig, während **146** bereits nach fünf Minuten und **147** nach knapp acht Minuten umgesetzt wurden. Für die Verbindungen **146** und **147** wurde die normierte integrierte Peakfläche des UV-Spektrums der HPLC-MS-Analyse gegen die Zeit aufgetragen, um den Zerfall des Eduktes sowie die Bildung der Addukte näher zu beschreiben (**Abbildung 3.37**).

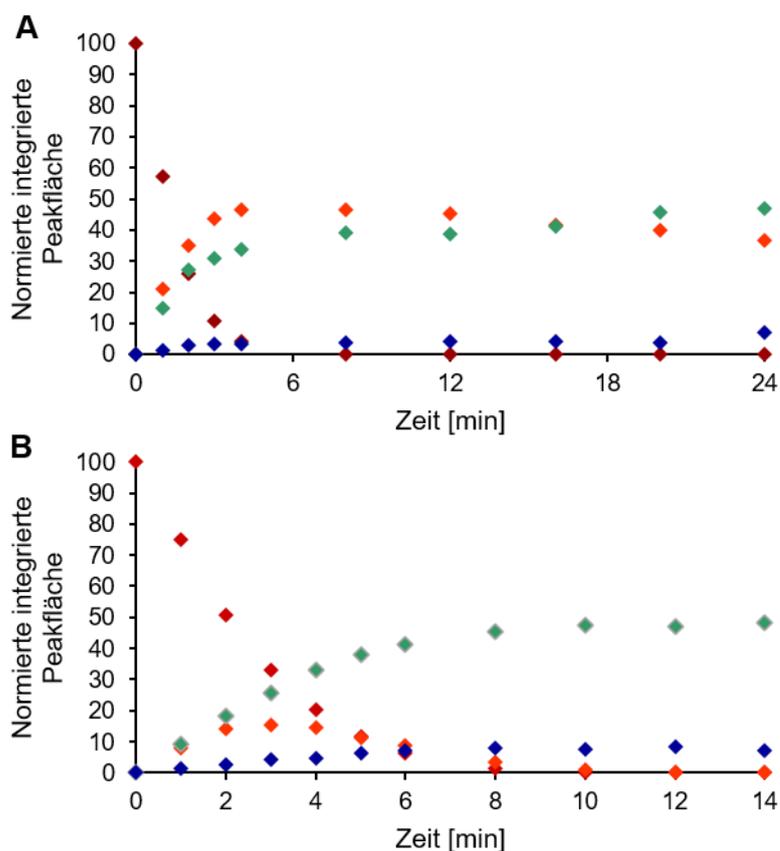


Abbildung 3.37: Zerfallskurven der Verbindungen **146** (A) und **147** (B) in Methanol. Rot zeigt die Edukte, orange die linearen Diazoverbindungen, grün die Addukte mit Methanol und blau die Addukte mit Wasser.

Bei Verbindung **147** (**Abbildung 3.37, B**) ist sehr deutlich eine kurze Zunahme der linearen Diazoverbindung (orange) zu beobachten, welches sich nach zehn Minuten vollständig zersetzt. Ebenfalls bilden sich stabile Methanol- (grün) und Wasser-Addukte (blau) aus. Verbindung **146** (**A**) weist bezüglich der Addukte ein ähnliches Verhalten auf, jedoch bildet sich hier eine langlebige lineare Diazoverbindung (orange) aus, welche nach 25 Minuten noch nicht vollständig zerfallen ist. Das eigentliche Edukt ist hingegen bereits nach rund fünf Minuten vollständig umgesetzt. Eine mögliche Ursache kann in der geringeren Lampen-Intensität von 10% im Vergleich zu den 30% bei **147** begründet sein. Bei der höheren Intensität bilden sich jedoch keine langlebigen Addukte aus, sodass eine Erhöhung der Strahlungsintensität in diesem Fall keine Alternative darstellt. Im nächsten Schritt für die Vorbereitung der Bestrahlung zusammen mit den NS2B-NS3-Proteasen wurde das Photolyseverhalten im Assay-Puffer 2 untersucht. Für diese Versuche wurden 0.4 mM Stammlösungen der Inhibitoren in DMSO hergestellt und eine 200 μM Verdünnung mit Assay-Puffer 2 für die Bestrahlung eingesetzt. **Abbildung 3.38** zeigt die Zerfallskurven beider Verbindungen.

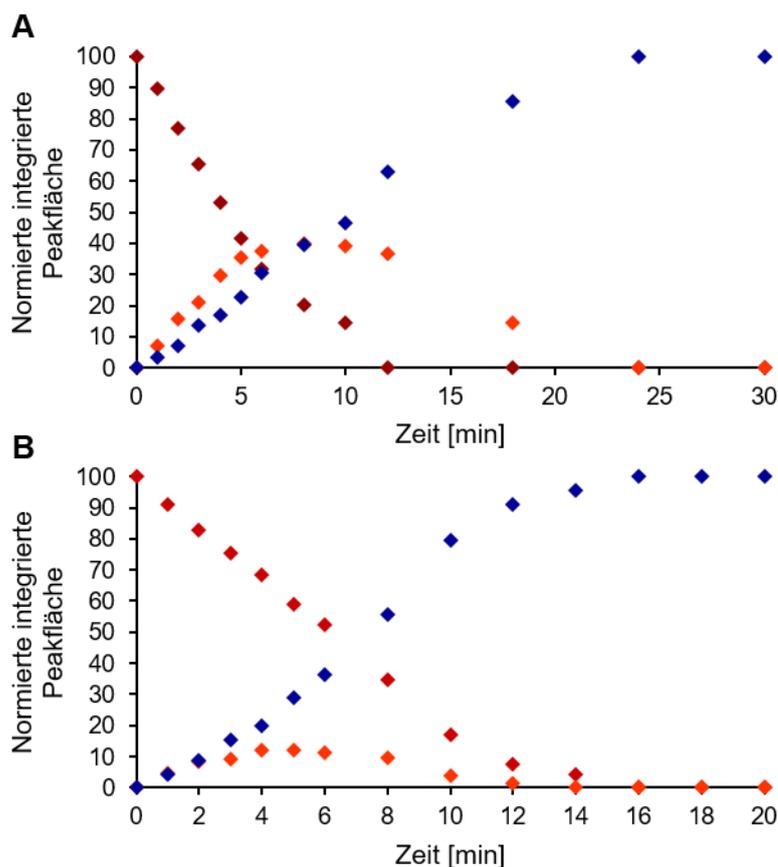


Abbildung 3.38: Zerfallskurven der Verbindungen **146** (A) und **147** (B) im Assay-Puffer 2. Rot zeigt die Edukte, orange die lineare Diazoverbindungen und blau die Addukte mit Wasser.

Zunächst wird deutlich, dass sowohl bei Verbindung **146** (Abbildung 3.38, A) und **147** (B) die lineare Diazoverbindung (orange) über die Zeit zerfällt und nicht wie bei Verbindung **146** in Methanol stabil bleibt. Ebenfalls zeigen beide Verbindungen einen Umsatz der Ausgangsstrukturen (rot) unter gleichzeitiger Bildung der Wasser-Addukte (blau). Die Kurven von **146** geben darüber Aufschluss, dass sich dieses nach ca. 12 Minuten vollständig zersetzt und die Bestrahlungszeit mindestens 24 Minuten betragen sollte, bis sich das lineare Produkt ebenfalls umgesetzt hat. Für Verbindung **147** sind hingegen 16 Minuten bis zur vollständigen Reaktion ausreichend. Beide Substanzen eignen sich dementsprechend für die Umsetzung mit den NS2B-NS3-Proteasen von Dengue- und Zikavirus (vgl. Abschnitt 3.2.4).

Zusätzlich zum Verhalten der Verbindungen nach der Photolyse wurden die Fragmentierungsmuster der Trifluormethyldiazirine **146** und **147** analysiert. Diese Ergebnisse sollen die Auswertung der Massenspektren mit den entsprechenden Peptidfragmenten unterstützen bzw. erleichtern (vgl. Abschnitt 3.2.5).

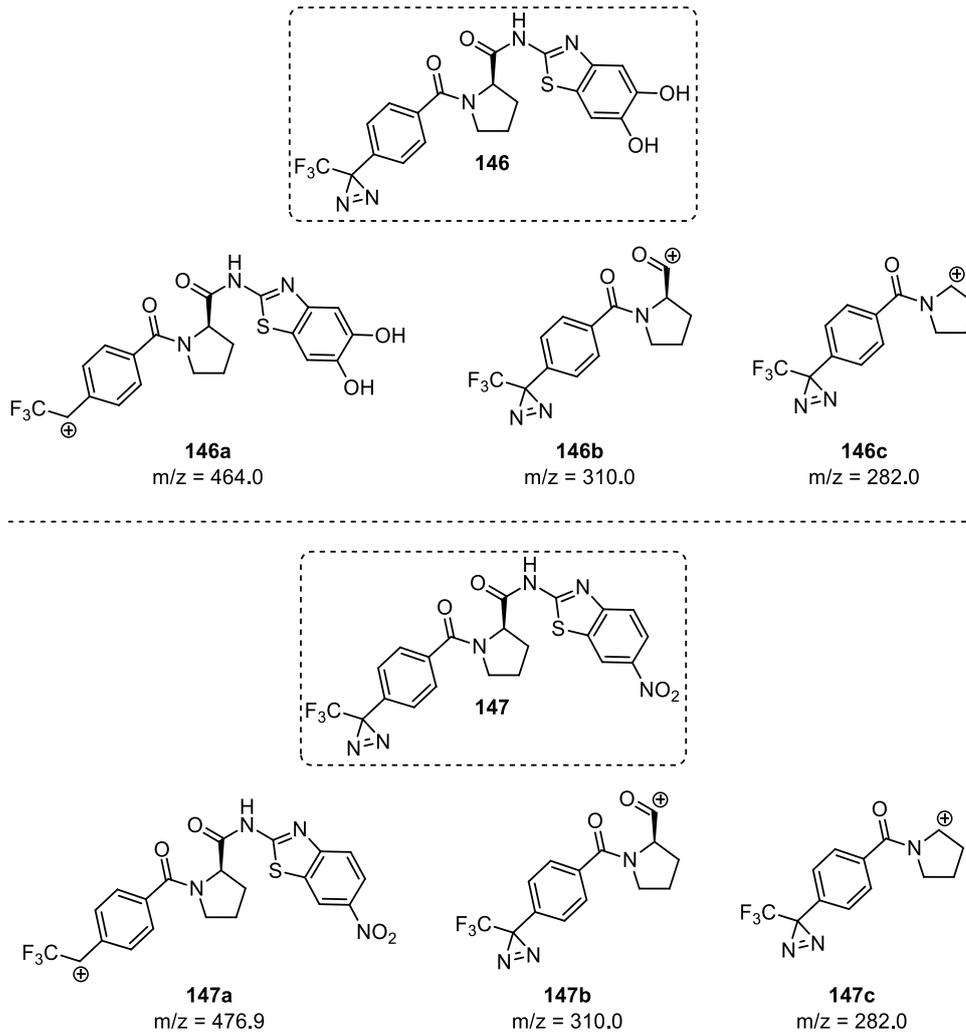


Abbildung 3.39: Fragmentierung der Verbindungen **146** und **147**.

Beide Verbindungen zeigen gleiche Fragmentierungsmuster und können im Massenspektrum eindeutig zugeordnet werden. Der Basispeak mit der höchsten Intensität im Massenspektrum war in beiden Fällen die Verbindungen **146b** und **147b**, die weiter zu **146c** und **147c** fragmentierten.

3.2.4 Photoaffinitätsmarkierung der NS2B-NS3-Protease

Anhand der Ergebnisse der Kinetikstudien wurden die Verbindungen **146** und **147** für die Bestrahlungsexperimente mit den NS2B-NS3-Proteasen des DENV und ZIKV ausgewählt. Die durchgeführten Experimente sind in **Tabelle 3.22** zusammengefasst. Die Proteasen wurden zunächst für 10 Minuten auf Eis mit den Inhibitoren inkubiert, anschließend mit einer UV-Lampe bei 365 nm bestrahlt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 3.22: Bestrahlungsexperimente mit den Verbindungen **146** und **147** an der NS2B-NS3-Protease von DENV und ZIKV.

#	NS2B-NS3-Pro	Enzymkonz. [nM]	Inhibitor (c = μm)	365 nm
DENV2				
1		5000	-	-
2		125	DMSO	+
3		125	146 (10)	+
4		125	146 (150)	-
5		125	146 (150)	+
6		125	147 (50)	+
7		125	147 (250)	-
8		125	147 (250)	+
ZIKV				
9		1000	-	-
10		25	DMSO	+
11		25	146 (7.5)	+
12		25	146 (30)	-
13		25	146 (30)	+
14		25	147 (50)	+
15		25	147 (250)	-
16		25	147 (250)	+

Reaktionsbedingungen: $\lambda = 365$ nm, Verbindung **146**: 24 Minuten Bestrahlungszeit, 10% Intensität, Abstand 2 cm, Verbindung **147**: 16 Minuten Bestrahlungszeit, 30% Intensität, 2 cm Abstand.

Die Konzentration der Inhibitoren wurden dabei im Bereich der IC_{50} -Werte und in einem höheren Überschuss gewählt (vgl. **Tabelle 3.22**). Als Negativkontrollen dienten zum einem die reinen Proteasen mit DMSO nach Bestrahlung (#1, #9) und zum anderen die Proben mit höheren Inhibitorkonzentrationen ohne Bestrahlung (#4, #7, #12, #15). Dies sollte einerseits zeigen, welche möglichen Veränderungen grundsätzlich durch die Bestrahlung am Enzym entstehen können. Andererseits sollte geklärt werden, ob die Verbindungen auch ohne Bestrahlung eine kovalente Bindung eingehen, sollten diese beispielsweise nicht lichtstabil sein. Grundsätzlich wird jedoch davon ausgegangen, dass die Proben weitestgehend stabil sind, da Untersuchungen mittels LC-MS auch nach zwei Stunden im Tageslicht keine Veränderung des Massenspektrums aufwiesen (siehe Anhang. **Abbildung 11.4**).

3.2.5 Massenspektrometrische Analyse der NS2B-NS3-Proteasen

In der Arbeitsgruppe von [REDACTED] wurden die Proben von [REDACTED] und [REDACTED] für massenspektrometrische Untersuchungen vorbereitet und die

Ergebnisse ausgewertet. Hierfür war es zunächst erforderlich an den nativen Proteasen den Verdau zu evaluieren und die Zuordnung der entstandenen Peptidfragmente mit der Sequenz abzugleichen. Das am häufigsten für enzymatischen Verdau eingesetzte Protein ist Trypsin („Goldstandard“ der Proteomik).^[170] Peptidbindungen werden C-terminal an den Aminosäuren Lysin und Arginin gespalten und es werden durchschnittlich Peptide mit einer Länge von rund 14 Aminosäuren generiert. Diese tragen meist zwei positive Ladungen und eignen sich somit für CID-MS Analysen (*collision induced dissociation*, Fragmentierungsmethode).^[170] Weiterhin erzeugen die Peptide nach tryptischem Verdau MS/MS-Fragmentierungsspektren, welche eine zuverlässige Peptididentifizierung mit entsprechenden Sequenzierungsprogrammen (z. B. PEAKS Studio 8.5, *Bioinformatics Solutions Inc.*) ermöglicht. Alternativ führen Endoproteinasen wie Asp-C, Glu-C oder Lys-C zu hohen Spaltungseffizienzen und Spezifikationen. Eine weniger spezifische, aber pH-stabile Variante im sauren Bereich ist der Verdau mit Pepsin-Proteasen.^[170] Beide NS2B-NS3-Proteasen wurden aufgrund der vielen Vorteile ebenfalls erst einem tryptischen Verdau unterzogen. Die Sequenzabdeckung für ZIKV betrug dabei 84% und für DENV 80%. Dieser zeigte vor allem für das ZIKV bereits eine hohe Sequenzabdeckung (~84%). Alternativ wurde die Serinprotease Glu-C verwendet, welche die Peptidbindungen C-terminal an Glutamat- und Aspartatresten hydrolysiert.^[171] Mit dieser Methode wurden Sequenzabdeckungen von 48% (ZIKV) und 45% (DENV) erreicht. **Abbildung 3.40** zeigt schematisch, welche Aminosäuren nach dem Verdau mit Trypsin und Glu-C anhand der detektierbaren Peptide zugeordnet werden können.^s

^s Die Originaldaten sind dem Anhang (**Abbildung 11.5–Abbildung 11.8**) beigelegt.

DENV2-NS2B-NS3-Protease (#1)

Try MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLAADLELERAADVRWEEQAEISGSSPILSITISEDGSMISIKNEEEEQTLGGGGSGGGGA
 Glu-C MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLAADLELEERAADVRWEEQAEISGSSPILSITISEDGSMISIKNEEEEQTLGGGGSGGGGA
 Try GVLWDVPSPPPVGKAELEDGAYRIKQKGAAGYSQIGAGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGG
 Glu-C GVLWDVPSPPPVGKAELEDGAYRIKQKGAAGYSQIGAGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGG
 Try GWKLEGEWKEGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGTIGAVSLDFSPGTSGPSIVDKKGVVGLYNGVTRSGAY
 Glu-C GWKLEGEWKEGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGTIGAVSLDFSPGTSGPSIVDKKGVVGLYNGVTRSGAY
 Try VSAIANTEKSIEDNPEIEDDIFRK
 Glu-C VSAIANTEKSIEDNPEIEDDIFRK

ZIKV-NS2B-NS3-Protease (#9)

Try MGSSHHHHHGSENLYFQGSDMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEDDGPPMAGGGGSGGGGSGALW
 Glu-C MGSSHHHHHGSENLYFQGSDMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVEDDGPPMAGGGGSGGGGSGALW
 Try DVPAPKEVKKGETTDGVYRVMTRRLGSGTQVGVGMQEGVFHTMWHVTKGSALRSGEGRLDPYWGDKQDLVSYCGPWKL
 Glu-C DVPAPKEVKKGETTDGVYRVMTRRLGSGTQVGVGMQEGVFHTMWHVTKGSALRSGEGRLDPYWGDKQDLVSYCGPWKL
 Try DAAWDGHSEVQLLAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYNGVVIKNGSYVSAI
 Glu-C DAAWDGHSEVQLLAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSGSPILDKCGRVIGLYNGVVIKNGSYVSAI
 Try TQGRREEETPVECFEPSMLKK
 Glu-C TQGRREEETPVECFEPSMLKK

Abbildung 3.40: Sequenzabgleich nach enzymatischen Verdau mit Trypsin (grün, DENV 80%, ZIKV 84%) und Glu-C (blau, DENV 45%, ZIKV 48%) der NS2B-NS3-Protease von DENV2 und ZIKV.

Anschließend wurden die Kontrollen #2 (DENV) und #10 (ZIKV) untersucht. Aufgrund der wesentlich geringeren Proteinmenge konnten die Signale der Massenspektren jedoch nicht eindeutig denen der höherkonzentrierten Kontrollen #1 und #9 zugeordnet werden (siehe **Abbildung 11.9**, **Abbildung 11.10** im Anhang). Grundsätzlich können aber keine wesentlichen Veränderungen in den Signalen beobachtet werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Bestrahlung nur einen geringen oder keinen Einfluss auf die Proteasen hat.

Für die mit Inhibitor (**146**, **147**) bestrahlten Proben konnten keine gesicherten Aussagen getroffen werden. Nach Auswertung der Daten gab es keine Hinweise auf Veränderungen in der Peptidsequenz, da diese nicht eindeutig zugeordnet werden konnten (unvollständiger Sequenzabgleich, da Signale zu schwach). Ebenfalls wurden keine typischen Fragmente der Inhibitoren gefunden (siehe oben). Eine mögliche Ursache stellt die eingesetzte Substanzmenge dar. Im Vergleich zu den nativen Proteinen wurde wesentlich weniger Protein für den Verdau und die MS-Analyse eingesetzt und die Proben ließen sich grundsätzlich schlechter ionisieren. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Versuchsdurchführung. Gegebenenfalls müssen die

Inkubationszeiten mit dem Inhibitor variiert werden. Zusätzlich sollten die Proben zeitnah nach der Bestrahlung vermessen werden, falls diese nicht über längeren Zeitraum bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabil sind. Führt dies nicht zum gewünschten Erfolg, ist es ratsam zusätzlich eine Reportereinheit an das Molekül anzubringen. Somit kann sichergestellt werden, dass es unter den gewählten Bedingungen zu einer Ausbildung der kovalenten Bindung kommt. Beispielsweise kann ein zusätzlicher Fluorophor nach der Bestrahlung die Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Protein mittels SDS-PAGE visuell bestätigen. Eine Isotopenmarkierung kann ebenfalls zum Nachweis der photomarkierten Komponente eingesetzt werden. Diese Methode ist jedoch durch die Verfügbarkeit der Reagenzien sowie der Halbwertzeiten limitiert.^[169] Diese Experimente waren nicht mehr Bestandteil dieser Doktorarbeit, könnten aber in weiteren Arbeiten zum experimentellen Nachweis für die Bindung der nicht-kompetitiven Inhibitoren in der allosterischen Tasche der DENV- und ZIKV-Protease dienen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die zwei Hauptprojekte dieser Arbeit hatten zum Ziel die DENV2-NS2B-NS3-Protease sowie einen nicht-kompetitiven Inhibitor selektiv mit einem oder zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe zu markieren.

Einzel- und Doppelmutanten (Cystein-Mutanten) der DENV2-NS2B-NS3-Protease wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen ATTO 488, ATTO 647N und Cy5 markiert und der Einfluss der Mutation sowie der Fluoreszenzmarkierung auf die kinetischen Eigenschaften untersucht. Durch Einführung der Mutationen verringerte sich im Allgemeinen die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) im Vergleich zur Wildtyp-Protease (z. B. S79C-S158C = $6.2 \mu\text{M}$, WT = $52.0 \mu\text{M}$). Die zusätzliche Fluoreszenzmarkierung wirkte sich hingegen nicht weiter aus. Auch die grundsätzliche Affinität der fluoreszenzmarkierten Proteasen zum Substrat wird nicht wesentlich beeinflusst (K_M). Des Weiteren wurde die inhibitorische Wirkung der nicht-kompetitiven Inhibitoren **8** und **30** sowie des kompetitiven Inhibitors **31** auf die (fluoreszenzmarkierten) Mutanten getestet.

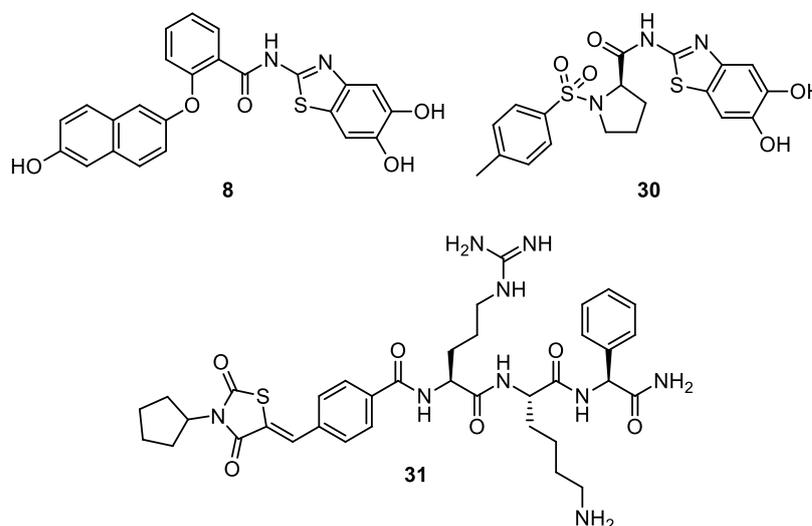


Abbildung 4.1: Nicht-kompetitive Inhibitoren **8** und **30** und kompetitiver Inhibitor **31**.

Alle drei Verbindungen zeigten die zu erwartende prozentuale Inhibitionen bei Inhibitorkonzentrationen von $20 \mu\text{M}$. Auch hier konnte kein negativer Einfluss durch die Mutationen oder Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden. Abschließend wurde ein Puffersystem ohne Glycerol untersucht, da dies häufig fluoreszierende Verunreinigungen bei Anregungswellen von $\lambda = 488 \text{ nm}$ aufweist und somit vor allem

Einzelmolekül-Experimente stört. Durchgeführt wurde dieser Versuch an der Doppelmutante DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C (ATTO 488, ATTO 647N) mit dem nicht-kompetitiven Inhibitor **8**. Die Zugabe von Glycerol zum Puffersystem zeigte keinen bedeutenden Effekt auf die inhibitorische Wirkung. Zur Minimierung unspezifischer Markierungen durch hydrophobe Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen, an beispielsweise Lysine, wurde zusätzlich ein Markierungsprotokoll durch Experimente an der Wildtyp-Protease erstellt. In weiterführenden Arbeiten könnte ein Konzept erarbeitet werden, bei welchem die Markierungseffizienzen (DOL) für beide Fluoreszenzfarbstoffe verbessert werden, um in den idealen Bereich von über 90% DOL zu gelangen. Um die Selektivität der Markierung weiter zu verbessern, könnten alternativ nicht-proteinogene Aminosäuren in die Sequenz inkloniert werden. Dies ermöglicht beispielsweise eine Farbstoffmarkierung über selektive Azid-Alkin-Click-Reaktion und verringert somit das Potenzial kovalente Bindungen mit anderen Aminosäuren einzugehen.^[172,173]

Die von [REDACTED] durchgeführten Experimente (smFRET-Messungen, FCS-Burst-Experimente) zeigten zudem unter anderem Änderungen beziehungsweise Stabilisierungen der Konformation der DENV2-NS2B-NS3-Protease (S79C-S178C, ATTO 488/ATTO 647N und ATTO 488/Cy5) durch Zugabe des kompetitiven Inhibitors **31** und der Substrate **32** und **33**. Die drei Verbindungen stabilisieren die geschlossene Konformation, wohingegen erste Untersuchungen darauf hindeuten, dass der nicht-kompetitive Inhibitor **30** die offene Konformation begünstigt. In fortführenden Studien liegt der Fokus auf dem Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energie-Transfer (smFRET) an immobilisierten Proteasemolekülen.

Die Entwicklung und Synthese eines modifizierten nicht-kompetitiven Inhibitors basierte zu Beginn des Projektes auf der Leitstruktur **8**.

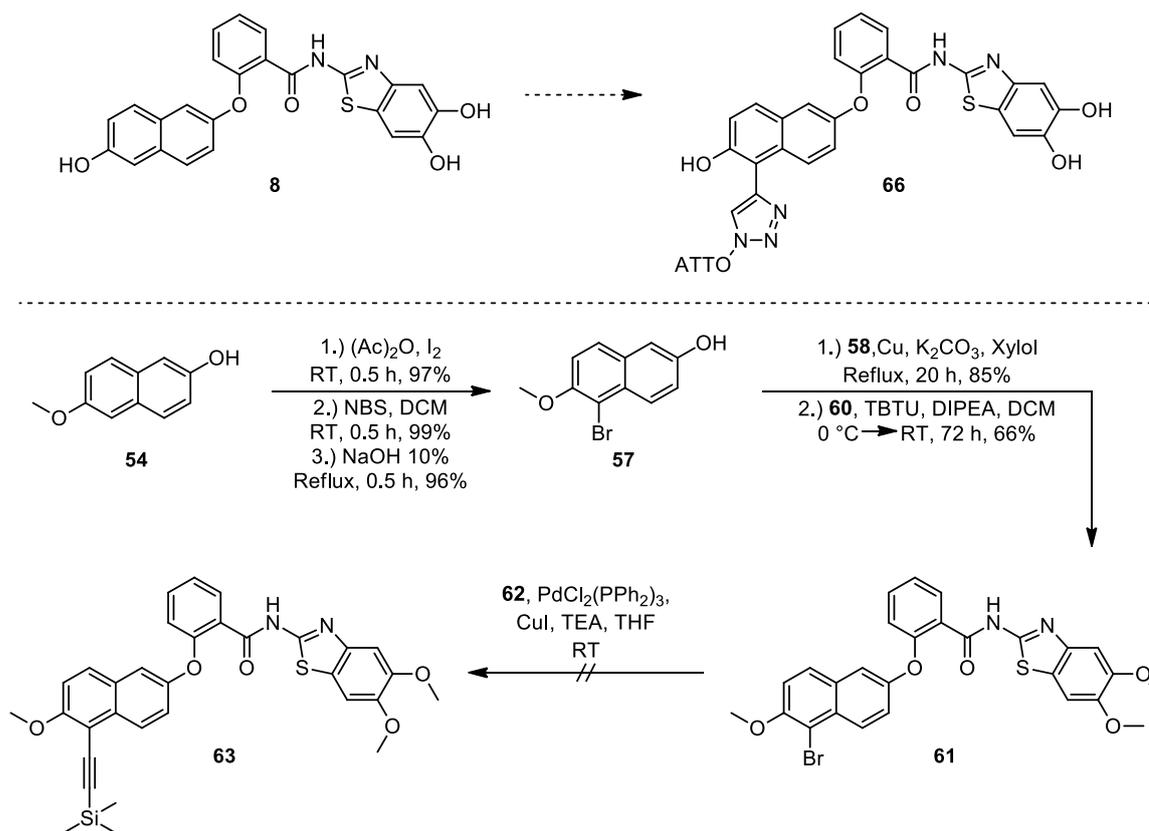


Abbildung 4.2: Modifikation der Leitstruktur **8** (oben) und durchgeführte Synthesen (unten).

Die Einführung eines Bromsubstituenten in Position C-5 (Naphthalin, **61**) in das Grundgerüst der Leitstruktur **8** wurde erfolgreich in einer fünfstufigen Synthese durchgeführt. Die Palladium(II)-katalysierte Transmetallierungsreaktion nach Sonogoshira führte unter den angewandten Reaktionsbedingungen nicht zum Erfolg (Abschnitt 3.1.2.2). Eine Optimierung der Reaktion wurde nicht verfolgt. Es stellte sich heraus, dass die Leitstruktur **8** sowohl im Ensemble, als auch bei Einzelmolekülmessungen, starken Einfluss auf die Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer des Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647N nahm. Als mögliche Ursache können hydrophobe Wechselwirkungen angenommen werden. Infolgedessen wäre es nicht möglich, Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften durch den modifizierten Inhibitor (**66**) aussagekräftig zu bewerten. Nach Weiterentwicklung der Verbindung **8** zu hydrophileren Strukturen mit dem Grundgerüst **80** wurden neue Synthesestrategien ausgearbeitet (**Abbildung 4.3**).^[136] Darauf basierend wurden zunächst die Grundbausteine **89** und **92** hergestellt und um Moleküleinheiten erweitert, die die erforderliche funktionelle Gruppe (Alkin (**100**), Carbonsäure (**95**), Amin (*m/p*-**108**, *m/p*-**112**), Thiol (**134**)) für die Umsetzung mit Fluoreszenz-

farbstoffen tragen. Zudem wurde eine weitere Thiol-Verbindung (**132**) aus dem Grundbaustein **60** hergestellt.

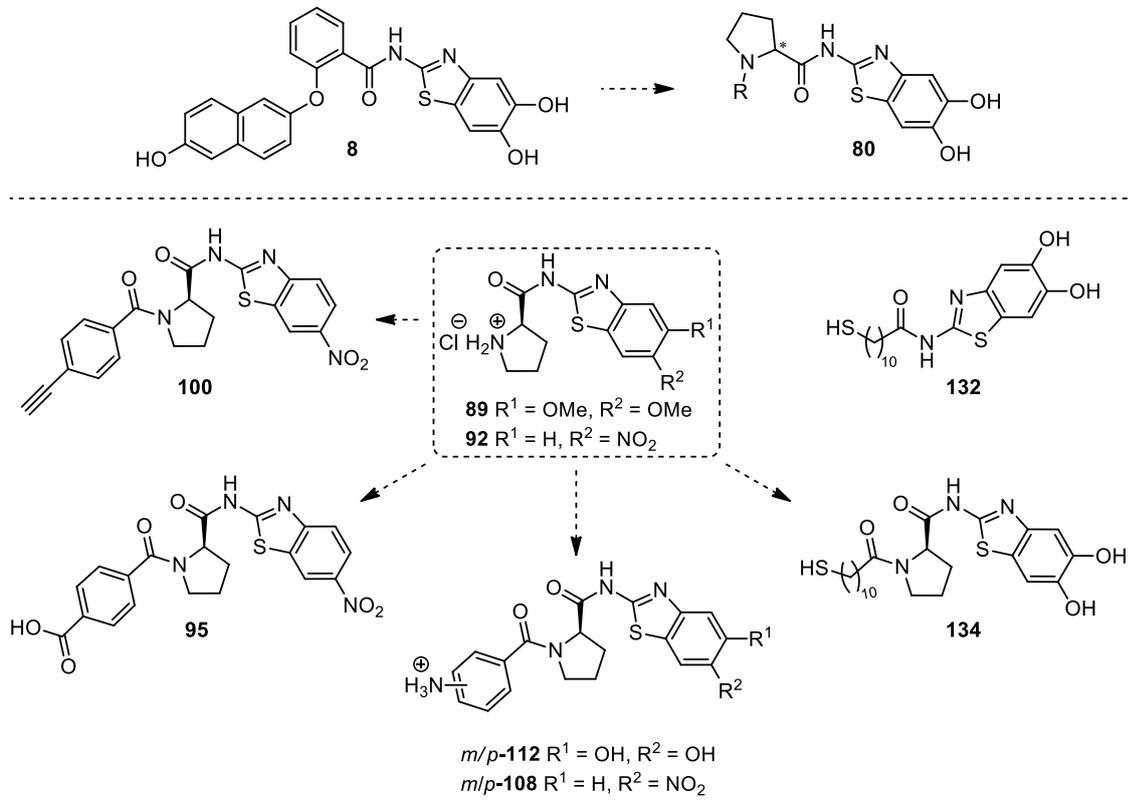


Abbildung 4.3: Ausgangsstrukturen für die Umsetzung mit Modellsubstanzen und Fluoreszenzfarbstoffen.

Die erstellte Substanzbibliothek diene als Grundlage für die Evaluierung optimaler Reaktionsbedingungen mit den Modellsubstanzen (**38–44**), bevor eine Kupplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt wurde. Es konnten durch Umsetzung von NHS-Estern mit Aminderivaten oder durch TBTU-Kupplungen in erster Linie 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Derivate hergestellt werden, deren IC_{50} -Werte im Bereich von 50–60 μM lagen. Der vielversprechendste Ansatz beruhte auf einer Thiol-Maleimid-Reaktion von 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Derivaten mit der Modellsubstanz **41**. Bereits die Ausgangsverbindungen **132** und **134** zeigten eine besser inhibitorische Wirkung im fluorimetrischen Assay an der DEN2-NS2B-NS3-Protease (**132**: $\text{IC}_{50} = 15.3 \mu\text{M}$, **134**: $\text{IC}_{50} = 15.7 \mu\text{M}$). Nach Umsetzung von Verbindung **132** mit der Modellsubstanz **41** wurde ein für 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Derivate akzeptabler IC_{50} -Wert erhalten (**136**, $\text{IC}_{50} \approx 5 \mu\text{M}$). Die Reaktion wurde schließlich für die Umsetzung des Thiol-Derivates **132** mit ATTO 488 erfolgreich durchgeführt und es wurde Verbindung **138** hergestellt.

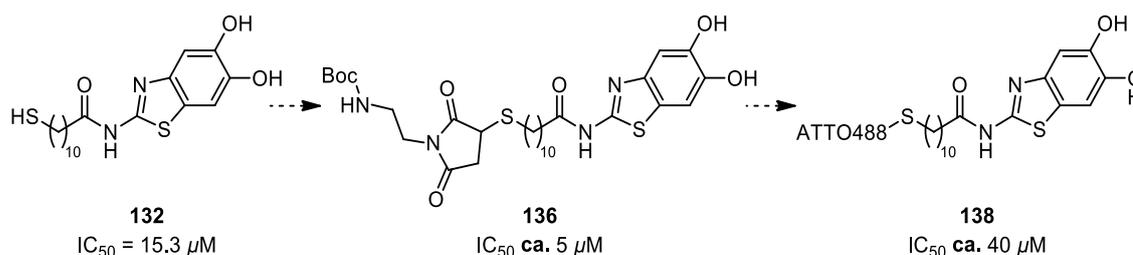


Abbildung 4.4: Thiol-Derivat **132** nach Umsetzung mit der Modellsubstanz **41** zur Verbindung **136** und dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 488 zur Verbindung **138**.

Aufgrund der geringen Substanzmenge und des Einflusses von ATTO 488 auf das Fluoreszenzsubstrat AMC im Enzymassay konnte der IC_{50} -Wert nur näherungsweise bestimmt werden ($IC_{50} \approx 40 \mu M$). Untersuchungen (FCS-Experimente) von [REDACTED] mit der DENV-WT-Protease zeigten, dass im Bereich der erforderlichen Inhibitorkonzentration ähnliche Wechselwirkungen des fluoreszenzmarkierten Inhibitors **138** im Vergleich zum freien Fluoreszenzfarbstoff ATTO 488 auftreten. Dadurch ist es nicht möglich, Veränderungen eindeutig den potenziellen Inhibitor-Protease-Wechselwirkungen zuzuordnen. Erste synthetisierte Cy5-markierte Inhibitoren weisen auf eine bessere inhibitorische Aktivität im fluorimetrischen Assay hin. So können sich zukünftige Arbeiten mit der Testung dieser Substanzen (**131** + Cy5, **132** + Cy5, **134** + Cy5) beschäftigen und gegebenenfalls weitere Optimierungen durchführen. Ebenfalls von Interesse ist die Fluoreszenzmarkierung eines kompetitiven Inhibitors wie beispielsweise **31**.

Der Schwerpunkt eines weiteren Projektes lag auf der Erstellung und Untersuchung einer kleinen Substanzbibliothek von nicht-kompetitiven Inhibitoren mit einer photo-reaktiven Gruppe zur Photoaffinitätsmarkierung der NS2B-NS3-Proteasen des DEN- und ZIK-Virus. Unter Erhalt der für die Bindung in die allosterische Bindetasche essenziellen 5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-Struktur bzw. 6-Nitrobenzo[d]thiazol-Struktur wurden sechs Derivate synthetisiert und die inhibitorische Wirkung untersucht (**Abbildung 4.5**).

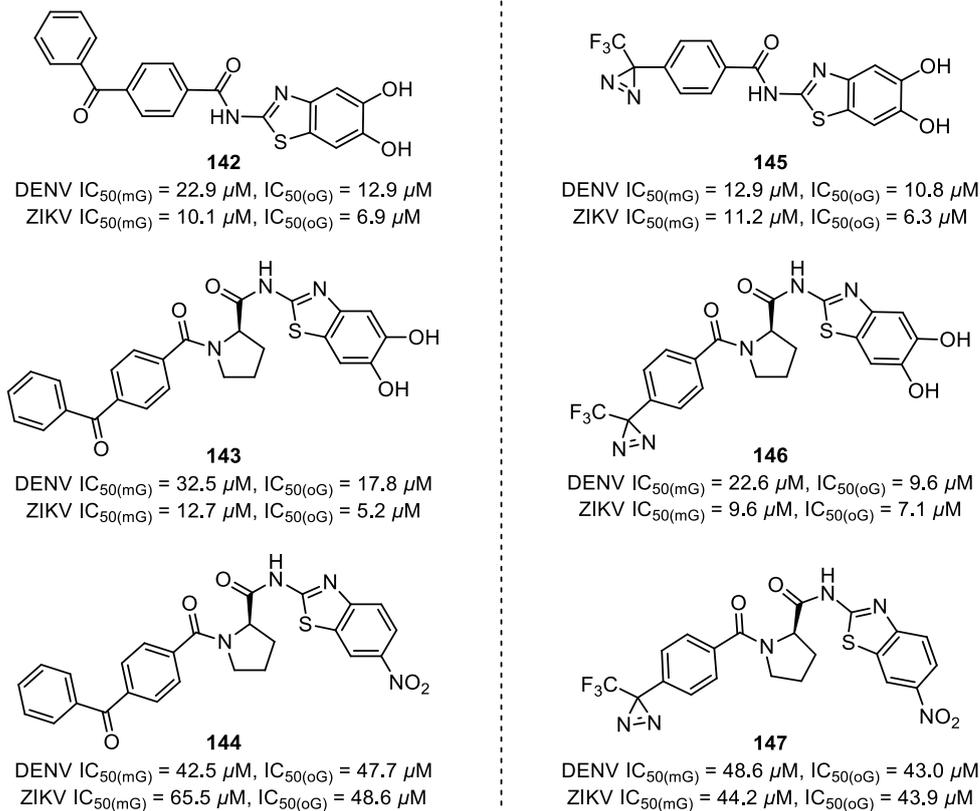


Abbildung 4.5: Photoaffinitätsproben mit mikromolarer Inhibition der DENV- und ZIKV-NS2B-NS3-Protease. (mG = Assay-Puffer mit Glycerol, oG = Assay-Puffer ohne Glycerol).

Im fluorimetrischen Assay wurde bestätigt, dass zum einen die Inhibition der 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Verbindungen **142**, **143**, **145** und **146** im Vergleich zu den 6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-Verbindungen **144** und **147** grundsätzlich besser ist. Zum anderen wurde wie erwartet die ZIKV-NS2B-NS3-Protease von den 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Verbindungen mit Ausnahme von Verbindung **145** stärker inhibiert. Parallel wurde untersucht, welchen Einfluss die Abwesenheit des Glycerol-Zusatzes im Assay-Puffer auf die Enzymaktivität und die inhibitorische Wirkung der Photoaffinitätsproben hat. Für die 5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-Verbindungen **142**, **143**, **145** und **146** wurde tendenziell eine bessere Inhibition der NS2B-NS3-Proteasen beobachtet, wohingegen die Verbindungen **144** und **147** eine annähernd gleiche Wirkung zeigten. Die entscheidenden Bestrahlungsexperimente können somit ohne Glycerol im Assay-Puffer durchgeführt werden, was vorteilhaft bei der Auswertung der Massenspektren ist. Die Bestrahlung (in MeOH, $\lambda = 365$ nm) der Verbindungen **143** und **144**, mit Benzophenon als photoreaktiver Gruppe, verdeutlicht, dass sich diese Verbindungen entweder ohne Ausbildung stabiler Addukte (**143**) vollständig

zersetzen oder eine Bestrahlungszeit von mehr als 30 Minuten erforderlich ist (**144**). Die photochemischen Eigenschaften der Verbindungen **146** und **147**, mit einer Diazirin-Einheit als photoreaktiver Gruppe, erwiesen sich hingegen sowohl in Methanol als auch im Assay-Puffer 2 als aussichtsreich. Es bildeten sich stabile Addukte mit Wasser aus und die Edukte setzten sich in einer angemessenen Zeit um (**Abbildung 4.6**).

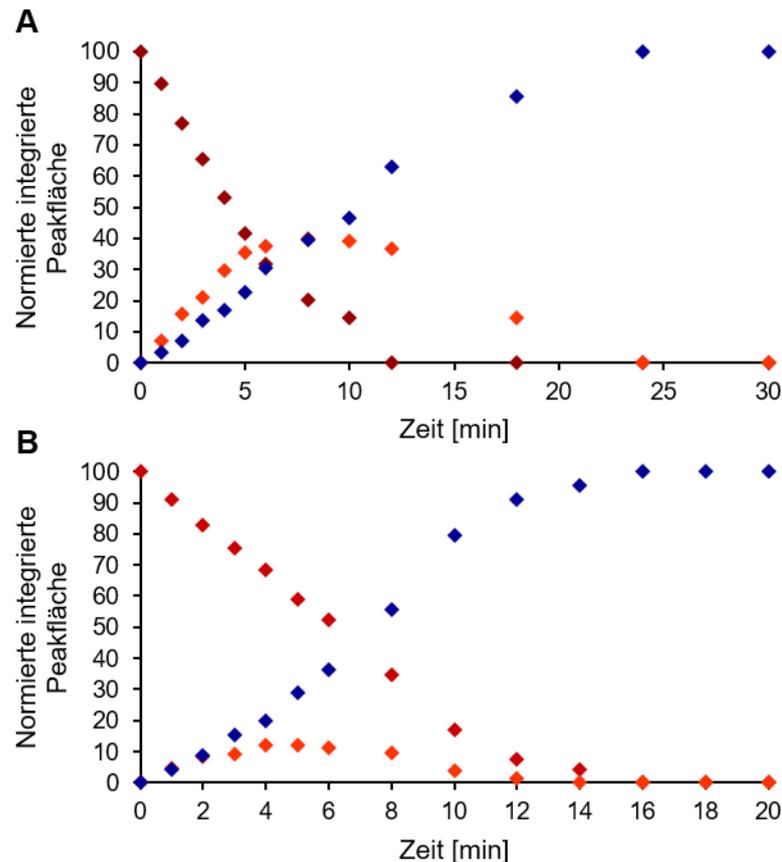


Abbildung 4.6: Zerfallskurven im Assay-Puffer 2 nach Bestrahlung mit $\lambda = 365$ nm (**146 (A)**, **147 (B)**). Edukte (rot), lineare Addukte (orange), Wasser-Addukte (blau).

Es wurden ebenfalls erste Bestrahlungsexperimente der Verbindungen **146** und **147** zusammen mit den NS2B-NS3-Proteasen des DEN- und ZIK-Virus durchgeführt. Hier gelang jedoch nur bei den Kontrollproben (reine Proteasen ohne Inhibitor und Bestrahlung) die Zuordnung der entstandenen Peptidfragmente anhand der Aminosäuresequenzen. Aufgrund der geringen Konzentrationen konnten bei den bestrahlten Proben keine charakteristische Peptidfragmente detektiert werden. Somit war es nicht möglich, potenzielle Veränderungen durch kovalente Bindungen der Inhibitoren zu erkennen. Das Ziel weiterführender Arbeiten ist es, die

Bestrahlungsexperimente (Photoaffinitätsprobe plus NS2B-NS3-Protease) mit höheren Proteinkonzentrationen zu wiederholen. Sollte dies nicht erfolgreich sein, können zur Überprüfung einer erfolgreichen Photolysereaktion Reportereinheiten (Fluoreszenzfarbstoffe oder Isotope) eingeführt werden. Mittels SDS-PAGE könnte nachvollzogen werden, ob sich nach Bestrahlung eine kovalente Bindung zwischen der Protease und der Photoaffinitätsprobe ausgebildet hat.

II Experimenteller Teil

5 Geräte

Avatar 330 FT-IR-Spektrometer	ThermoNicolet (Thermo Scientific, Dreieich, Dtl.)
Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Dtl.)
Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, Dtl.)
Five Easy pH-Meter	Mettler Toledo (Gießen, Dtl.)
Fourier 300 Kernresonanz-Spektrometer	Bruker (Ettlingen, Dtl.)
Gelelektrophorese-Kammer	BioRad (Feldkirchen, Dtl.)
Gelelektrophorese-Netzteil	BioRad (Feldkirchen, Dtl.)
High Power UV-LED smart Lampe	Opsytec Dr. Gröberl GmbH (Ettlingen, Dtl.)
HP Agilent 1100 Series HPLC-Anlage	Agilent (Waldbronn, Dtl.)
INCU-Line Brutschrank	VWR (Darmstadt, Dtl.)
Infinite F200 PRO microplate reader	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Kern ACJ/ACS Feinwaage, Kern PU Waage	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Dtl.)
KSP1N-Schmelzpunktmessgerät	A.KRÜSS Optronic GmbH (Hamburg, Dtl.)
MH15-Magetrührer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)
NanoDrop™ 2000/2000c UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Scientific (Dreieich, Dtl.)
NGC™ Chromatographie-System	BioRad (Feldkirchen, Dtl.)
pH-Meter CG840	Schott (Mainz, Dtl.)
Polarimeter P3000	A.KRÜSS Optronic GmbH (Hamburg, Dtl.)
Quantum Gel Dokumentationssystem	Peqlab (VWR-Life Science, Darmstadt, Dtl.)
RS-VA 10 Vortexer	Phoenix Instruments (Garbsen, Dtl.)
SONOPULS-Ultraschall-Homogenisator	BANDELIN (Berlin, Dtl.)
Sorvall Lynx 6000 Centrifuge Primus 25	Thermo Scientific (Dreieich, Dtl.)
Typhoon TRIO+ Imager and Scanner	Amersham Biosciences (GE-Healthcare, München, Dtl.)
VARIAN ProStar HPLC System	AlphaChrom (Möhlin, Schweiz)
ViewPix 700 Gel-Scanner	Biostep (Burkhardtshof, Dtl.)

6 Software

Software	Verwendung	Anbieter/Version
ChemDraw	Formeln und Reaktionsgleichungen	ChemBioDraw Ultra 12.0.2.1076
GraFit	K_M und IC_{50} -Werte	GraFit 5.0.13
LeadIT	Docking	leadIT-2.1.6
MestReNova	Auswertung Massenspektren und NMR-Spektren	MestReNova-12.0.0-20080 (32/64 MB), Mestrelab Research
Microsoft Office	Datenerstellung/Zusammenfassung, Grafiken und Datenanalyse	Microsoft Office 365 ProPlus (16.0.11929.20234)
MOE	Modellierung von <i>small molecules</i> und Einführung von Mutationen in PDB-Strukturen	MOE 2019.01
Microsoft PowerPoint	Grafiken	Microsoft Office 365 ProPlus (16.0.11929.20234)
ProtParam tool	Berechnung chemischer und physikalischer Parameter für Proteine	ExpASy (https://web.expasy.org/protparam/)
PyMOL	Visualisierung von Proteinstrukturen	PyMOL V5

7 Biochemischer Teil

7.1 Materialien

7.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

Die eingesetzten Lösungen wurden mit Feinchemikalien der Firmen *Sigma Aldrich*, *Roth* und *Fisher Scientific* sowie Milli-Q-Wasser (ggf. autoklaviert) hergestellt.

Tabelle 7.1: Zusammensetzung der Puffer und Medien.

Assay-Puffer 1	1 mM CHAPS, 50 mM Tris·HCl, 20% Glycerol, pH 9
Assay-Puffer 2	1 mM CHAPS, 50 mM Tris·HCl, pH 9
NGC™-Puffer 1	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, pH 8
NGC™-Puffer 2	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH 8
Lyse-Puffer	20 mM Tris·HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0.1% Triton X 100 (v/v), pH 6.8/8
Markierungs-Puffer 1	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, pH 6.8/7
Markierungs-Puffer 2	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH 6.8/7
Markierungs-Puffer 3	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CHAPS, 0.5 mM TCEP, pH 6.8
Markierungs-Puffer 4	8.00 g NaCl, 0.20 g KCl, 1.44 g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O, 0.24 g KH ₂ PO ₄ , 0.5 mM TCEP, 1 L H ₂ O, pH 7.4
Wasch-Puffer Nickel-Säule 1	20 mM Tris·HCl, 300 mM NaCl, pH 6.8/8
Wasch-Puffer Nickel-Säule 2	20 mM Tris·HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 6.8/8
Elutions-Puffer Nickel-Säule	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol pH 6.8/8
Dialyse-Puffer 1	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, pH 6.8/8
Dialyse-Puffer 2	20 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH 6.8/8
Dialyse-Puffer 3	20 mM Tris·HCl, 300 mM NaCl, pH 6.8
SDS-PAGE Sammelgel 5%	30% Acrylamid-Mix, 1.0 M Tris·HCl (pH 6.8), 10% SDS, 10% APS, 1% TEMED, H ₂ O _{dest.}
SDS-PAGE Trenngel 15%	30% Acrylamid-Mix, 1.5 M Tris·HCl (pH 8.8), 10% SDS, 10% APS, 1% TEMED, H ₂ O _{dest.}
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	144 g Glycin, 30 g Tris, 10 g SDS, 1 L H ₂ O _{dest.}

Coomassie Färbelösung	0.5 g Coomassie, 200 mL EtOH, 10mL H ₃ PO ₄ , 290 mL H ₂ O
Entfärber-Lösung	30% EtOH, 2% H ₃ PO ₄ , 68% H ₂ O
TAE Puffer (50x)	2 M Tris·HCl (pH 8.2-8.4), 1 M HAc, 50 mM EDETA

7.1.2 Marker und Ladepuffer

Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (BioRad)

Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (BioRad)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™)

Ladepuffer SDS-PAGE[†] (200 mM Tris·HCl (pH 6.8), 400 mM DTT, 8% SDS, 0.4% Bromphenolblau, 40% Glycerol)

7.1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

	Firma	MW/MW ⁺ [g/mol]	λ_{abs} [nm]	ϵ_{max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{fl} [nm]	CF ₂₈₀
Cy5-Maleimid	GE-Healthcare	817	649	2.5 x 10 ⁵	670	0.05
ATTO 647N-Maleimid	ATTO-TEC	868/768	646	1.5 x 10 ⁵	664	0.03
ATTO 647N-Carboxy		746/646				
ATTO 488-Maleimid	ATTO-TEC	1067/712	500	9.0 x 10 ⁴	520	0.09
ATTO 488-Carboxy		804/590				

Die Farbstoffe wurden wahlweise in trockenem DMF oder DMSO gelöst. Genauere Angaben können in den entsprechenden Abschnitten entnommen werden.

[†] Der Ladepuffer wurde von Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Jun.-Prof. Dr. ██████████ hergestellt.

7.1.4 Kits und Verbrauchsmaterialien

Material	Anwendung	Anbieter
KAPA HiFi HotStart PCR Kit	PCR Zubehör	Roche
Geneaid Cat. N. DFH300 Gene Hlow™ Gel/PCR Kit	Reinigung der PCR-Probe	Geneaid
E.Z.N.A Plasmid-DNA Mini-Kit	Isolierung von Plasmid DNA	Omega Bio-Tek
Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS	Fluoreszenzmarkierung der Protease	NanoTemper Technologies
Vivaspin 6 und 20	Zentrifugalkonzentrator (MWCO 10.0 kDa)	GE Healthcare
ZelluTrans	Dialyseschlauch (MWCO 3.5 und 12.0 kDa)	Roth
PD MiniTrap™ G10 (Dextran- Matrix)	Pufferaustausch, Proteinreinigung	GE Healthcare
pH-Fix 0–14	pH-Teststreifen	Macherey-Nagel

7.1.5 DENV-NS2B-NS3_Mutanten

Protease/Mutante	Aminosäuresequenz
NS2B-NS3 linked, Thrombinschnittstelle, His ₆ -Tag	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLAADLELERAADVWRWEEQAE ISGSSPILSITISEDGSMSEKNEEEEEQTLGGGGSGGGGAGVLWDV PSPPPVCKAELEDGAYRIKQKGAAGYSQIGAGVYKEGTFHTM WHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGEW KEGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGTIGAVSLDFSP GTSGSPIVDKKGKVVGLYGNGVVTRSGAYVSAIANTEKSIEDNP EIEDDIFRK
NS2B-NS3-G14C linked, Thrombinschnittstelle, His ₆ -Tag	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLAADLELERAADVWRWEEQAE ISGSSPILSITISEDGSMSEKNEEEEEQTLGGGGSGGGGAGVLWDV PSPPPVCKAELEDGAYRIKQKGAAGYSQIGAGVYKEGTFHTM WHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGEW KEGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGTIGAVSLDFSP GTSGSPIVDKKGKVVGLYGNGVVTRSGAYVSAIANTEKSIEDNP EIEDDIFRK
NS2B-NS3-G14C linked, ohne His ₆ -Tag	GSHMLAADLELERAADVWRWEEQAEISGSSPILSITISEDGSMSE KNEEEEEQTLGGGGSGGGGAGVLWDVPSPPPVCKAELEDGAYR IKQKGAAGYSQIGAGVYKEGTFHTMWHVTRGAVLMHKGKRIE PSWADVKKDLISYGGGWKLEGEWKEGEEVQVLALEPGKNPR AVQTKPGLFKTNTGTIGAVSLDFSPGTSGSPIVDKKGKVVGLY GNGVVTRSGAYVSAIANTEKSIEDNPEIEDDIFRK

NS2B-NS3-S79C linked, TEV-Schnittstelle, His ₆ -Tag	MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMLAADLELERAADVWRWEEQ AEISGSSPILSITICEDGSMSEIKNEEEEQTLGGGGSGGGGAGVLW DVPSPPVVGKAELEDGAYRIKQKGAAGYSQIGAGVYKEGTFHT MWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGE WKEGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGTIGAVSLDF SPGTSGSPIVDKKGKVVGLYGNVGVTRSGAYVSAIANTEKSIED NPEIEDDIFRK
NS2B-NS3-S79C-G14C linked, TEV-Schnittstelle, His ₆ -Tag	MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMLAADLELERAADVWRWEEQ AEISGSSPILSITICEDGSMSEIKNEEEEQTLGGGGSGGGGAGVLW DVPSPPVCKAELEDGAYRIKQKGAAGYSQIGAGVYKEGTFHT MWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGE WKEGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGTIGAVSLDF SPGTSGSPIVDKKGKVVGLYGNVGVTRSGAYVSAIANTEKSIED NPEIEDDIFRK
NS2B-NS3-S79C-S158C linked, Thrombinschnittstelle, His ₆ -Tag	MGSSHHHHHHSSGENLYFQGHMLAADLELERAADVWRWEEQ AEISGSSPILSITICEDGSMSEIKNEEEEQTLGGGGSGGGGAGVLW DVPSPPVVGKAELEDGAYRIKQKGAAGYSQIGAGVYKEGTFHT MWHVTRGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGE WKEGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNTGTIGAVSLDF SPGTSGSPIVDKKGKVVGLYGNVGVTRCGAYVSAIANTEKSIED NPEIEDDIFRK

7.1.6 Enzyme und Polymerasen

Kapa-Polymerase (*Kapa Biosystems*)

Desoxyribonuclease I (DNase) (*Sigma Aldrich*)

Ribonuclease (RNase) (*Sigma Aldrich*)

DpnI (*New England BioLabs*)

Lysozym (*Sigma Aldrich*)

7.1.7 Antibiotika

Ampicillin (100 mg/mL in ddH₂O)

7.1.8 *E. coli* Stämme

BL21-Gold (DE3) (*Agilent Technologies*)

DH5 α (*Agilent Technologies*)

7.1.9 Plasmide und Vektoren

pET-15b (Konstruktionsvektor für die gelinkte Protease, Ampicillinresistenz)

7.1.10 Oligonukleotide

Tabelle 7.2: Oligonukleotide für Mutagenese.

Name	Sequenz 5'→3'	T _M [°C]
NS3-G14Cfor	CCGCCGGTGTGCAAAGCAGAACTGGAAGAC	77
NS3-G14Crev	CTGCTTTGCACACCGGCGGCGGAGACGG	80

Tabelle 7.3: Oligonukleotide für DNA-Sequenzierung.

Name	Sequenz 5'→3'
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

7.2 Allgemeine Methoden

7.2.1 Molekularbiologische Methoden

7.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der DNA sowie die ortsspezifische Mutagenese erfolgten mittels Polymerase-Kettenreaktion. Verwendet wurde ein KAPA HiFi HotStart PCR Kit und ein Thermozykler (Primus 25). Methylierte DNA wurde durch einen DpnI-Verdau entfernt und das PCR-Produkt mit einem Geneaid Cat. N. DFH300 Gene Hlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid) nach Herstellerangaben gereinigt. Die genauen Bedingungen werden bei den entsprechenden Experimenten aufgeführt.

7.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mit einem 1%igem Agarose Gel (w/v in 1x TAE Puffer). Das Gel wurde mit einer Ethidiumbromid-Lösung (0.033% v/v) gefärbt und mit Hilfe von UV-Licht (Quantum Gel Dokumentationssystem) ausgewertet.

7.2.1.3 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente *E. coli*^u Zellen (50 μL) wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 0.5 μL des entsprechenden Vektors versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert (vgl. Abschnitt 7.3). Anschließend wurde 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt und wiederholt zwei Minuten auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von 300 μL LB-Medium und Inkubation für 1.5 Stunden bei 37 °C. Die komplette Bakteriensuspension wurde auf mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) versetzten LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.2.1.4 Reinigung der Plasmid-DNA

5 mL mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) versetztes LB-Medium wurde mit einer Kolonie der transformierten DH5 α -Zellen angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Schüttler bei 37 °C (225 rpm). Anschließend wurde die Plasmid-DNA nach dem Herstellerprotokoll des E.Z.N.A Plasmid-DNA Mini-Kit I gereinigt.

7.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten DNA wurde in einer Dreifachbestimmung am NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ ermittelt. Die Konzentration wurde mittels des Lambert Beer Gesetzes (**Formel 7.1**) bestimmt.

$$c [\text{mol}/\text{L}] = \frac{A}{E \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right] \cdot b [\text{cm}]} \quad 7.1$$

7.2.1.6 Sequenzierung

Mit den entsprechenden Oligonukleotiden (7.1.10) wurde die gereinigte Plasmid-DNA (ca. 500 ng) im Labor GENterprise GENOMICS (StarSEQ GmbH, JGU Mainz) sequenziert.

^u Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden unter Verwendung von CaCl_2 in der Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Dr. ■■■ hergestellt.

7.2.2 Biochemische Methoden

Alle das Protein betreffende Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt.

7.2.2.1 Proteinexpression

Mit mehreren Kolonien der mit dem entsprechenden Vektor transformierten (Abschnitt 7.2.1.3) BL21Gold (D₃)-Zellen wurde LB-Medium (5 mL, 100 µg/mL Ampicillin) angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C (225 rpm) inkubiert. 4 mL dieser Vorkultur wurden in 2 L frisches LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) überführt. Anhand der optischen Dichte (OD₆₀₀) wurde das Zellwachstum verfolgt. Die Induktion der Expression mit IPTG (1 mM) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ca. 0.5. Nach Inkubation über Nacht (20 °C, 225 rpm) wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Minuten, 5000 rpm), der Überstand entfernt und das Zellpellet tiefgefroren (-20 °C). Mittels SDS-PAGE wurde die Expression überprüft. Spezifische Angaben sind unter Abschnitt 7.3 aufgeführt.

7.2.2.2 Bakterienaufschluss

Das Zellpellet der Expressionskultur wurde mit Lyse-Puffer, Benzamidin (1 mM), DTT (1 mM), PMSF in Isopropanol (1 mM), DNase (1 mM), RNase (1 mM) und Lysozym (1 mM) versetzt und mittels invertieren gelöst. Durch Behandlung mit Ultraschall (5 Zyklen, je 40 s und 30% Power, 10 x oder 5 Zyklen, 60 s, 50% Power, 10 x) wurden die Zellen aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (40 Minuten, 20 krpm). Der Überstand wurde für die Proteinreinigung verwendet und das Pellet verworfen.

7.2.2.3 Proteinreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Der Proteinextrakt der Lyse wurde auf eine mit Nickel-NTA Agarose (Firma Qiagen, Hilden, Dtl.) befüllte GravityFlow-Säule aufgetragen. Nicht und unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Puffern mit geringen Imidazolkonzentrationen (0–20 mM) entfernt. Die NS2B-NS3-Protease war über einen Polyhistidin-Tag an das Säulenmaterial fixiert und wurde durch Pufferlösungen mit hohen Imidazolkonzentrationen (200–250 mM) eluiert und fraktioniert. (Die verwendeten Volumina sind bei den entsprechenden Experimenten aufgeführt.) Diese

wurden vereinigt und über einen Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) konzentriert.

7.2.2.4 Proteinreinigung mittels Gel-Permeations-Chromatographie

Das Proteingemisch wurde auf ein Volumen von 1–5 mL konzentriert und bei 4 °C auf die Säule überführt (Superdex™75 10/300 GL, HiLoad 16/60 Superdex 75 pg, HiLoad 16/600 Superdex 200 pg). Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 0.4–0.5 mL pro Minute und die Detektion bei $\lambda = 280$ nm, gegebenenfalls zusätzlich bei 501 nm sowie 644 nm oder 647 nm. Die Fraktionen mit gereinigtem Protein wurden bei Bedarf vereinigt, aufkonzentriert (Vivaspin 6 und 20, CutOff 10 kDa) und die Proteinkonzentration am NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer bestimmt. Die Messung wurde bei einer $\lambda = 280$ nm durchgeführt und die Konzentration basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet (vgl. Abschnitt 7.2.3.2, Formel 7.1). Die gereinigten Proteine wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C in NGC™-Puffer 1 oder NGC™-Puffer 2 gelagert.

7.2.2.5 Fluoreszenzmarkierungen

Die Markierungen mit den entsprechenden Farbstoffen sowie alle darauffolgenden Schritte fanden, soweit es möglich war, unter Lichtausschluss statt. Die verwendeten Farbstoffe sind unter Abschnitt 7.1.3 aufgeführt. Die Markierungen orientieren sich an Vorschriften von ATTO-TEC^[121], LERNER *et al.*^[174], ALLEN *et al.*^[175] und DE BOER *et al.*^[176].

Markierung nach Umpuffern

Die gereinigte NS2B-NS3 Protease wurde langsam auf Eis aufgetaut und anschließend in einen Vivaspin-Membranfilter (CutOff 10 kDa) überführt. Es wurde ca. 5–10 mit einem insgesamt 10–15 fachen Volumen des entsprechenden Puffers zentrifugiert (3900 rpm). Der pH-Wert wurde zusätzlich mit pH-Teststreifen der Firma *Macherey-Nagel* (pH-Fix 0–14) überprüft. Die umgepufferte Proteinlösung wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert, mit Farbstoff versetzt und zwei Stunden (Maleimid-Farbstoffe) bei Raumtemperatur oder vier Stunden bei 4 °C (Iodacetamid-Farbstoffe) inkubiert. Freier Farbstoff wurde durch Zentrifugation (Membranfilter, CutOff 10 kDa) und/oder Dialyse (ZelluTrans, MWCO 3.5 und 12.0 kDa, Roth) entfernt und das Protein mittels Gel-Permeations-Chromatographie (Abschnitt 7.2.2.4) gereinigt und isoliert.

Markierung nach der Nickel-Affinitätschromatographie

Das Zellpellet der Proteinexpression wurde wie unter Abschnitt 7.2.2.2 beschrieben behandelt und der Überstand auf eine Nickel-NTA-Säule (siehe Abschnitt 7.2.2.3) überführt. Das Protein wurde mit entsprechenden Pufferlösungen von der Nickel-NTA-Säule eluiert und wie unter „Markierung nach Umpuffern“ beschrieben behandelt.

Entfernung des freien Farbstoffs

Überschüssiger Farbstoff wurde wiederholt durch Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) und Zentrifugation (3900 rpm) vom Protein abgetrennt, bis der Durchfluss optisch klar war. Anschließend wurde über Nacht in entsprechenden Puffer dialysiert (ZelluTrans, MWCO 3.5 und 12.0 kDa, Roth). Die anschließende Isolierung erfolgte durch Gel-Permeation-Chromatographie (Abschnitt 7.2.2.4).

7.2.2.6 SDS-PAGE

Für 15%-ige Trenngele wurden die Komponenten (vgl. **Tabelle 7.1**) vermischt und für ca. 30 Minuten in einer Gelkammer polymerisiert. Zur Polymerisation wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um einen ebenmäßigen, geraden Abschluss des Gels zu erhalten. Nach Entfernung des Isopropanols mit Filterpapier wurde das Trenngel mit 5%-igem Sammelgel (vgl. **Tabelle 7.1**) überschichtet, ein Taschenkamm eingefügt und ebenfalls ca. 30 Minuten polymerisiert. Der Aufbau der Gelkammer erfolgte nach Herstellerangaben (BioRad). Die Proben wurden mit $\frac{1}{4}$ des Probevolumens an vierfach konzentrierten Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Bei einem Stromfluss von 90–110 V wurden die Proben bis zum Trenngel gesammelt und bei 150–190 V erfolgte die anschließende Trennung. Alle Gele wurden mit Coomassie (**Tabelle 7.1**) für 30–50 Minuten gefärbt und anschließend für 10–16 Stunden entfärbt (**Tabelle 7.1**). Gele mit fluoreszenzmarkierten Proben wurden vor der Färbung und Entfärbung am Typhoon-TRIO+ detektiert (Abschnitt 7.2.3.1).

7.2.3 Fluoreszenzdetektion

7.2.3.1 Typhoonscanner

Gele der SDS-PAGE mit fluoreszenzmarkierten Proteinen wurden vor der Coomassie-Färbung am Typhoon-Trio+ gescannt. Für ATTO 647N und Cy5 wurde als Emmisionsfilter 670 BP 30 und ein Laser mit 633 nm verwendet. ATTO 488 wurde bei 526 SP und einer Wellenlänge von 532 nm detektiert.

7.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und Markierungseffizienz

Die Proteinkonzentration der markierten und nicht markierten Proteine wurde durch eine Dreifachbestimmung am NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer ermittelt. Reines Protein wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm gemessen und die Konzentration mittels des Lambert Beer Gesetztes (**Formel 7.1**) bestimmt. Der spezifische Extinktionskoeffizient wurde für jedes Protein basierend auf der Aminosäuresequenz mit dem Programm (*online tool*) ExPASy – ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) berechnet. Für fluoreszenzmarkierte Proteine wurden zusätzlich die spezifischen Parameter der Farbstoffe berücksichtigt (vgl. Abschnitt 7.1.3). Die Markierungseffizienz (DOL) wurde anhand der nachstehenden **Formel 7.2** ermittelt.

$$DOL = \frac{c(dye)}{c(protein)} = \frac{A_{max}/\epsilon_{prot}}{A_{prot}/\epsilon_{max}} = \frac{A_{max} \cdot \epsilon_{prot}}{(A_{280} - A_{max} \cdot CF_{280}) \cdot \epsilon_{max}} \quad 7.2$$

7.3 Durchgeführte Experimente

Die Plasmide sowie das Expressionskonstrukt für die Cysteinmutante DENV2-NS2B-NS3-G14C wurden in Zusammenarbeit mit [REDACTED] hergestellt. Alle weiteren Konstrukte für die entsprechenden Mutanten wurden von [REDACTED] und [REDACTED] zur Verfügung gestellt. Alle Experimente mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Versuche mit der Protease wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt.

7.3.1 Fluoreszenzmarkierung der DENV3-WT-Protease

Die Markierung der DENV3-WT-Protease erfolgte mit einem Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS nach dem beigefügten Markierungsprotokoll der Firma NanoTemper Technologies. Verwendet wurden 100 μL einer 20 μM Proteinlösung und ein dreifacher molarer Überschuss Farbstoff (NT-647-NHS).

7.3.2 Vektorkonstruktion zur Herstellung der DEN2-NS2B-NS3-G14C-Protease

Die Primer für das gelinkte Konstrukt DENV2-NS2B-NS3 wurden von [REDACTED] entworfen. In Zusammenarbeit wurden neben dieser Mutante noch weitere, hier nicht besprochene Mutanten hergestellt.

Die Mixtur sowie die Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion sind in **Tabelle 7.4** und **Tabelle 7.5** aufgeführt. Für gelinkte^v Konstrukte wurde als DNA-Vorlage das Plasmid pET15b NS2B-NS3 sowie die Oligonukleotide NS3 G14Cfor und NS3 G14Crev verwendet.

Tabelle 7.4: Zusammensetzung PCR-Mixtur.

Komponenten	Volumen [μL]
5x HiFi Puffer	5.00
dNTP Mix	0.75
KAPA HiFi Polymerase	0.50
DNA-Vorlage (ca. 40 ng/ μL)	0.50
Oligonukleotid (forward)	0.50
Oligonukleotid (reverse)	0.50
Milli-Q [®] H ₂ O	17.25

Tabelle 7.5: Parameter für einen PCR-Zyklus.

Schritt	Zeit	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]	Zyklen
Initiale Denaturierung	3 min	95	1
Denaturierung	20 s	98	} 30
Anlagerung	15 s	70	
Verlängerung	60 s/kbp	72	
Finale-Verlängerung	6.5 min	72	1

^v Es wurden ebenfalls ungelinkte Konstrukte entworfen, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird.

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und eine DNA-Bande im UV-Licht detektiert. Beim anschließenden Restriktionsverdau mit DpnI wurden die PCR-Produkte von methylierter DNA-Vorlage befreit. Das Reaktionsgemisch kann **Tabelle 7.6** entnommen werden.

Tabelle 7.6: Zusammensetzung DpnI-Verdau.

Komponenten	Volumen [μL]
PCR-Produkt	23.0
DpnI	1.0
Cut-Smart-Puffer	5.0
Milli-Q [®] H ₂ O	21.0

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit einem Geneaid Cat. N. DFH300 Gene Hlow™ Gel/PCR Kit nach Herstellerangaben gereinigt. In der ersten Elutionsfraktion (50 μL) waren 84.7 ng/ μL und in der zweiten (20 μL) 30 ng/ μL NS2B-NS3-G14C-pET-15b erhalten (Konzentrationsbestimmung siehe Abschnitt 7.2.1.5). Die zweite Fraktion (0.75 μL) wurde für die Transformation mit 50 μL DH5 α -Zellen, wie unter Abschnitt 7.2.1.3 beschrieben, verwendet. Die Plasmid-DNA wurde aus 5 mL Über-Nacht-Kultur (LB-Medium + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin) isoliert und folgende Konzentration bestimmt: Elution 1 = 94 ng/ μL und Elution 2 = 39 ng/ μL (Abschnitt 7.2.1.5).

7.3.3 Expression und Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-G14C-Protease

DENV2-NS2B-NS3-G14C ATTO 647N mit His₆-Tag

0.5 μL Plasmid (94 ng/ μL) wurden für die Transformation zu 50 μL kompetenten BL21Gold (D3) Zellen überführt und wie unter Punkt 7.2.1.3 aufgeführt, verfahren. 50 mL Ampicillin-haltiges (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) LB-Medium wurde mit mehreren Kolonien angeimpft und die Vorkultur schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 2 L LB-Medium mit 1 mL Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Endkonzentration)) und 4 mL der Vorkultur versetzt. Nach Induktion mit IPTG (20 mL, 100 mM (Stammlösung)) wurde ca. 20 Stunden inkubiert (20°C, 225 rpm) und anschließend wurden die Zellen geerntet (10 Minuten, 5000 rpm, Abschnitt 7.2.2.1), eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Für die Reinigung wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und mit 75 mL Lyse-Puffer (pH 8), 75 μL Benzamidin (1 M), 75 μL DTT (1 M), 750 μL (0.1 M), sowie je einer kleinen Spatelspitze DNase, RNase und Lysozym versetzt. Die Suspension wurde sechsmal mit Ultraschall behandelt (5 Zyklen, je 40 s und 30% Power) und anschließend zentrifugiert (40 Minuten, 20 krpm, Abschnitt 7.2.2.2). Der Überstand wurde auf eine, mit 4 mL Ni^{2+} -NTA beladene Säule aufgetragen (Abschnitt 7.2.2.3) und die Elution mit Nickel-Elutions-Puffer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, x mM Imidazol) wie folgt durchgeführt:

Tabelle 7.7: Elution mit aufsteigender Imidazolkonzentration.

Imidazol [mM]	Volumen [mL]	pH-Wert
20	12 (2 x)	8
50	12	7
75	12	7
100	12	7
150	12	7
200	12	7
250	12 (2 x)	7

Die Fraktionen mit einer Imidazolkonzentration von 75–250 mM wurden vereinigt und auf ein Volumen von 27.5 mL (3.42 mg/mL, $3.35 \cdot 10^{-6}$ mol) konzentriert. 1.02 mL (3.5 mg, $1.25 \cdot 10^{-7}$ mol) dieser Proteinlösung wurden mit einem 2.5-fachen molaren Überschuss ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff (0.27 mg/54 μL , $3.12 \cdot 10^{-7}$ mol) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung bei 4 °C über eine GPC (NGC™-Puffer 1) gereinigt (Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 0.96 μM (0.026 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-G14C + Farbstoff + His₆-Tag.^w

Die verbliebenen 26.5 mL Proteinlösung der Nickel-Affinitätschromatographie wurden aufgeteilt. Ein Teil wurde aufkonzentriert und über eine GPC (NGC™-Puffer 1) gereinigt (61.4 μM , 1.72 mg/mL). Der zweite Teil wurde für einen Verdau mit einer TEV-Protease verwendet.^x

^w Die DOL wurde für die Protease nicht bestimmt

^x Auf die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung wird an dieser Stelle verzichtet, da diese für die vorliegende Arbeit nicht relevant ist.

DENV2-NS2B-NS3-G14C ATTO 647N ohne His₆-Tag

Es wurden alle Schritte analog zu dem Konstrukt mit His₆-Tag durchgeführt (vgl. Abschnitte 7.2.2.1, 7.2.2.2, 7.2.2.3).

Die Proteinkonzentration nach der Nickel-NTA-Säule betrug 37.8 μM (1.06 mg/mL, 44.07 mg/41.5 mL). Ein Großteil der Proteinlösung wurde auf ein Volumen von 5 mL konzentriert und über Größenausschlusschromatografie konnten 56.5 μM reines Protein (1.58 mg/mL) erhalten werden.

Für die Farbstoffmarkierung wurden 3.24 mg (3.06 mL, $1.15 \cdot 10^{-7}$ mol) Protease und ein 2.5-facher molarer Überschuss ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff (0.25 mg/50 μL , $2.88 \cdot 10^{-7}$ mol) verwendet. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde die Proteinlösung aufgeteilt und in zwei separate Dialyseschläuche (ZelluTrans, 3 kDa) überführt. In einen Dialyseschlauch wurden zusätzlich 75 U Thrombin (gelöst in 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl) gegeben und beide für 16 Stunden bei 4 °C dialysiert (Dialyse-Puffer 1, pH 8). Anschließend wurde das mit Thrombin versetzte Proteingemisch über eine für umgekehrte immobilisierte Affinitätschromatographie (IMAC) mit 2 mL Ni²⁺-NTA befüllte Säule gegeben und inkubiert. Es folgten vier Waschgänge mit je 6 mL Nickel-Elutions-Puffer ohne Imidazol und drei Elutionen mit 250 mM Imidazolkonzentration. Mittels SDS-PAGE (Abschnitt 7.2.2.6) wurde überprüft, in welchen Fraktionen sich die Protease ohne His₆-Tag befindet. Diese wurden vereinigt und mittels GPC (Abschnitt 7.2.2.4) gereinigt (NGC™-Puffer 1). Der zweite Teil der Protease wurde nach der Dialyse ebenfalls über eine GPC gereinigt (NGC™-Puffer 1).

Ausbeute: 2.4 μM (0.07 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-G14C + Farbstoff - His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 21%.

Ausbeute: 4.6 μM (0.14 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-G14C + Farbstoff + His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 22%.

DENV2-NS2B-NS3-G14C Cy5 mit His₆-Tag

Versuchsdurchführung analog nach 7.2.2.1, 7.2.2.2, 7.2.2.3.

1.5 mg Protein ($5.34 \cdot 10^{-8}$ mol) wurden mit in 50 μL DMF gelösten Cy5-Maleimid-Farbstoff (0.25 mg, $3.06 \cdot 10^{-7}$ mol, 5.7-facher molarer Überschuss) versetzt und zwei

Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss schüttelnd inkubiert. Nach Dialyse über Nacht (Dialyse-Puffer 1, pH 8, ZelluTrans, 3 kDa) wurde mittels GPC (NGC™-Puffer 1) gereinigt (Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 7.2 μm (0.21 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-G14C + Farbstoff + His₆-Tag.

DOL: Cy5 27%.

7.3.4 Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-S79C-Protease

Gereinigte DENV2-NS2B-NS3-S79C-Protease (1 mL, 95 μM , gelagert in NGC™-Puffer 1 pH 8) wurde auf Eis aufgetaut und anschließend in einen Dialyseschlauch überführt (CutOff 12 kDa) und viermal für je zwei Stunden gegen 250 mL Dialyse-Puffer 1 (pH 7) dialysiert. Es wurde 1 mL Protein mit einer Konzentration von 68 μM (1.92 mg/mL) erhalten. 0.7 mL (1.34 mg, $4.76 \cdot 10^{-8}$ mol) wurden mit 200 μM TCEP (pH 5) versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 50 μL Cy5 ($3.06 \cdot 10^{-7}$ mol, 6.5-facher Überschuss) versetzt. Nach zwei Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur wurde über Nacht gegen Dialyse-Puffer 1 (pH 8, ZelluTrans) dialysiert. Die Reinigung und Entfernung des TCEP sowie freien Farbstoffes erfolgte mit PD MiniTrap™ G-10 Säulen (Ge Healthcare) nach Herstellerangaben. Es wurden zwei Säulen mit je 320 μL Proteinlösung beladen und mit NGC™-Puffer 1 (pH 8) eluiert. Über Fluoreszenzmessung mit einer 96 Well-Platte (Filter 630–670 nm) wurden die Fraktionen mit fluoreszenzmarkiertem Protein detektiert und anschließend vereint und aufkonzentriert.

Die restlichen 0.3 mL (0.57 mg) der umgepufferten Proteinlösung wurden ebenfalls mit 200 μM TCEP (pH 5) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses wurde vor der Markierung mit einer PD MiniTrap™ G-10 Säule entsprechend der Anleitung des Herstellers wieder entfernt (Dialysepuffer 1, pH 7). 0.21 mg Protein ($7.49 \cdot 10^{-9}$ mol) wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 50 μL ATTO647N ($2.88 \cdot 10^{-7}$ mol, 38-facher Überschuss) inkubiert und anschließend über Nacht dialysiert (Dialysepuffer 1, pH 8, ZelluTrans). Die Reinigung erfolgte mittels GPC (NGC™-Puffer 1, Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 25.9 μM (0.75 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-S79C + Cy5 + His₆-Tag.

DOL: Cy5 25%.

Ausbeute: 3.85 μM (0.11 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-S79C + ATTO 647N + His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 34%.

7.3.5 Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-S79C-G14C-Protease

1 mL einer 60 μM DEN2-NS2B-NS3-S79C-G14C^y Proteinlösung wurde in ein Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) überführt. Es wurde mit 3 x 2 mL, 2 x 3 mL und 1 x 5 mL Markierungs-Puffer 2 (pH 7) bei 4 °C zentrifugiert (3900 rpm, 5–10 Minuten). Der pH-Wert wurde zusätzlich mit Teststreifen (pH-Fix 0–14) überprüft. 1 mL Protease (39.5 μM ^z, 1.11 mg/mL, $3.9 \cdot 10^{-8}$ mol) wurde mit je 40 μL ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff ($2.3 \cdot 10^{-7}$ mol, 5.8-facher molarer Überschuss) und 40 μL ATTO 488-Maleimid-Farbstoff ($1.9 \cdot 10^{-7}$ mol, 4.7-facher molarer Überschuss) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde über Nacht gegen Dialysepuffer-Puffer 2 (pH 8, ZelluTrans) dialysiert und die Proteinlösung auf 1 mL Volumen konzentriert und mittel GPC (NGC™-Puffer 2) gereinigt (Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 39.7 μM (1.12 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-S79C-G14C + Farbstoff + His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 13%, ATTO 488 69%.

7.3.6 Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C-Protease

Eine 163 μM reine Lösung (350 μL) von DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C^{aa} (1.61 mg/mL) wurde in einem Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) bei 4 °C mit Markierungs-Puffer 3 (pH 6.8 + TCEP) umgepuffert (6 x 1 mL, 3900 rpm, 5 Minuten)

^y Das Protein wurde von ████████ hergestellt.

^z Konzentrationsverlust, da zu Beginn versehentlich ein falscher Membranfilter verwendet wurde.

^{aa} Von ████████ zur Verfügung gestellt.

und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit dem analogen Puffer ohne TCEP erneut mit einem Membranfilter umgepuffert (3 x 2 mL, 3900 rpm, 10 Minuten). Zu 1.9 mL der Proteinlösung (pH 6.8, 1.27 mg/mL, $4.50 \cdot 10^{-8}$ mol) wurden je 20 μ L ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff ($1.15 \cdot 10^{-7}$ mol, 2.6-facher molarer Überschuss) und 20 μ L ATTO 488-Maleimid-Farbstoff ($9.37 \cdot 10^{-8}$ mol, 2.1-facher molarer Überschuss) gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Der freie Farbstoff wurde mittels Membranfilter (3 x 2 mL, 1 x 5 mL, 3900 rpm, 5–10 Minuten) und Dialyse bei 4 °C entfernt (Markierungs-Puffer 3 ohne TCEP, über Nacht, ZelluTrans). Anschließend wurde mittels GPC (NGC™-Puffer 2) gereinigt (Abschnitt 7.2.2.4). Es wurden zwei Fraktionen gesammelt.

Ausbeute: 13.6 μ M (0.38 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C (P1) + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 59%, ATTO 488 36%.

Ausbeute: 11.7 μ M (0.33 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C (P2) + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 20%, ATTO 488 66%.

500 μ L (2.30 mg) der 163 μ M DENV2-NS2B-NS3-S79C-S158C wurden mit Markierungs-Puffer 3 (pH 6.8) in einem Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) umgepuffert (2 x 2 mL, 1 x 3 mL, 1 x 5 mL, 3900 rpm, 5–10 Minuten) und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das TCEP wurde mit Membranfiltern (CutOff 10 kDa) und dem analogen Puffer ohne TCEP wieder entfernt (2 x 2 mL, 1 x 5 mL, 3900 rpm, 5–10 Minuten). Die erhaltenen 850 μ L Protein (1.81 mg, $6.40 \cdot 10^{-8}$ mol) wurden mit 35 μ L ATTO 488-Maleimid-Farbstoff ($1.64 \cdot 10^{-7}$ mol, 2.6-facher molarer Überschuss) und 25 μ L Cy5-Maleimid-Farbstoff ($1.53 \cdot 10^{-7}$ mol, 2.4-facher molarer Überschuss) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Die Dialyse (ZelluTrans) über Nacht erfolgte gegen Dialyse-Puffer 1 (pH 6.8 plus 1 mM CHAPS) und die GPC-Reinigung mit NGC™-Puffer 1 (Abschnitt 7.2.2.4). Es wurden zwei Fraktionen erhalten.

Ausbeute: 14.3 μM (0.43 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-S79C (P1) + Farbstoff + His₆-Tag.

DOL: Cy5 54%, ATTO 488 46%.

Ausbeute: 11.2 μM (0.34 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-S79C (P2) + Farbstoff + His₆-Tag.

DOL: Cy5 40%, ATTO 488 58%.

7.3.7 Fluoreszenzmarkierung der DENV2-NS2B-NS3-WT-Proteasen

Der DEN2-NS2B-NS3-Wildtyp wurde von [REDACTED] als gereinigtes Protein oder Zellpellet zur Verfügung gestellt.

DENV2-NS2B-NS3-WT-1

Ausgehend von 151.4 μM DENV2-NS2B-NS3-WT (4.20 mg/mL) wurde mit einem Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) bei 4 °C mit Markierungs-Puffer 3 (pH 6.8 + TCEP) umgepuffert (4 x 2 mL, 3 x 3 mL, 2 x 5 mL, 3900 rpm, 5 Minuten). 1.7 mL des Wildtyps (74 μM , 2.07 mg/mL) wurden mit 40 μL ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff ($2.3 \cdot 10^{-7}$ mol, 1.8-facher molarer Überschuss) und 40 μL ATTO 488-Maleimid-Farbstoff ($1.9 \cdot 10^{-7}$ mol, 1.5-facher molarer Überschuss) versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Dialyse mit Dialysepuffer-Puffer 2 (pH 8, ZelluTrans) wurde die Wildtyp-Protease über GPC (NGC™-Puffer 2) gereinigt (vgl. Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 75.8 μM (2.12 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT+ Farbstoff + His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 0.73%, ATTO 488 1.33%.

DENV2-NS2B-NS3-WT-2 & 3

0.5 mL DENV2-NS2B-NS3-WT (151.4 μM , 4.2 mg/mL) wurden mit Tris·HCl (pH 7.0, Markierungs-Puffer 2) über einen Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) umgepuffert (3 x 2 mL, 2 x 3mL, 2 x 5 mL, 3900 rpm, 5–10 Minuten) sowie auf ein Volumen von 2 mL (23.2 μM , 0.65 mg/mL, $2.3 \cdot 10^{-8}$ mol) konzentriert. 1 mL dieser Proteinlösung (WT-2) wurde mit 25 μL Cy5-Maleimid-Farbstoff ($1.5 \cdot 10^{-7}$ mol, 6.6-facher molarer Überschuss) und 1 mL (WT-3) mit 40 μL ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff ($2.3 \cdot 10^{-7}$ mol, 10-facher molarer Überschuss) sowie 40 μL

ATTO 448-Maleimid-Farbstoff ($1.9 \cdot 10^{-7}$ mol, 8.1-facher molarer Überschuss) versetzt. Die Inkubation erfolgte zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Anschließend wurde freier Farbstoff mittels Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) entfernt, bis der Durchfluss optisch farblos war (1 x 4 mL, 5 x 3 mL, 2 x 2 mL mit Dialyse-Puffer 2, pH 7.0, 3900 rpm, 5–10 Minuten). Es wurde 2 x gegen 750 mL Dialyse-Puffer 2 (pH 7.0, 45 Minuten, ZelluTrans) sowie für 14 Stunden gegen 1 L Dialyse-Puffer 2 (pH 7.0, ZelluTrans). Die Proteinlösungen wurden mit Membranfiltern (Vivaspin, CutOff 10 kDa, 3900 rpm) auf 1 mL konzentriert und über GPC (NGC™-Puffer 2) gereinigt (Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 11.8 μM (0.33 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-2 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: Cy5 0.6%.

Ausbeute: 11.7 μM (0.33 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-3 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 1.7%, ATTO 488 8.4%.

DENV2-NS2B-NS3-WT-4 & 5

Analog zu WT-2 & 3 wurden 0.5 mL DENV2-NS2B-NS3-WT mit Markierungs-Puffer 4 (pH 7.4) mittels Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) umgepuffert (3 x 2 mL, 2 x 3 mL, 2 x 5 mL, 3900 rpm, 5–10 Minuten). Die erhaltenen 2 mL (27.3 μM , 0.76 mg/mL, $2.7 \cdot 10^{-8}$ mol) wurden aufgeteilt. Zu 1 mL WT-4 wurde 25 μL Cy5-Maleimid-Farbstoff ($1.5 \cdot 10^{-7}$ mol, 5.6-facher molarer Überschuss) und zu 1 mL WT-5 wurden je 40 μL ATT647N-Maleimid-Farbstoff ($2.3 \cdot 10^{-7}$ mol, 8.4-facher molarer Überschuss) sowie 40 μL ATTO 488-Maleimid-Farbstoff ($1.9 \cdot 10^{-7}$ mol, 6.9-facher molarer Überschuss) hinzugegeben. Die Inkubation und Reinigung erfolgte analog zu WT-2 & 3 (Dialyse gegen Markierungs-Puffer 4).

Ausbeute: 7.2 μM (0.20 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-4 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: Cy5 0.6%.

Ausbeute: 8.6 μM (0.24 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-5 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 1.4%, ATTO 488 9.8%.

DENV2-NS2B-NS3-WT-6 & 7

Je 0.5 mL DENV2-NS2B-NS3-WT (151.4 μM , 4.2 mg/mL) wurden mit Markierungs-Puffer 2 (WT-6) bzw. mit Markierungs-Puffer 3 (WT-7) auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt (Vivaspin, CutOff 10 kDa, 5 x4 mL, 3900 rpm, 10 Minuten). Es wurden jeweils 0.5 mL (WT-6: 54 μM , 1.52 mg/mL, $2.7 \cdot 10^{-8}$ mol und WT-7: 49 μM , 1.37 mg/mL, $2.4 \cdot 10^{-8}$ mol) mit 40 μL ATTO 647N-Carboxy-Farbstoff ($2.7 \cdot 10^{-7}$ mol WT-6: 9.9-facher; WT-7 9.2-facher molarer Überschuss) und 40 μL ATTO 488-Carboxy-Farbstoff ($2.5 \cdot 10^{-7}$ mol WT-6: 10-facher; WT-7 11-facher molarer Überschuss) versetzt. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit Membranfiltern (Vivaspin, CutOff 10 kDa) zentrifugiert (3900 rpm), bis der Durchfluss optisch farblos war, und über Nacht bei 4 °C dialysiert (WT-6: Markierungs-Puffer 2 und WT-7: Markierungs-Puffer 3). Die Reinigung mittels GPC erfolgte mit NGC™-Puffer 2 (Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 20.7 μM (0.58 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-6 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 0.1%, ATTO 488 1.2%.

Ausbeute: 14.1 μM (0.39 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-7 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 2.0%, ATTO 488 10.1%.

DENV2-NS2B-NS3-WT-8

Mit Markierungs-Puffer 3 (5 x 1 mL) und Membranfiltern (Vivaspin, CutOff 10 kDa) wurden 100 μL einer 500 μM Proteinlösung (14.0 mg/mL) umgepuffert (5 x 4 mL, 3900 rpm, 10 Minuten) und 0.8 mL (50.8 μM , 1.43 mg/mL, $4.1 \cdot 10^{-8}$ mol) erhalten. Die Farbstoffmarkierung erfolgte mit 40 μL ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff ($2.3 \cdot 10^{-7}$ mol, 5.6-facher molarer Überschuss) und 40 μL ATTO448-Maleimid-Farbstoff ($1.9 \cdot 10^{-7}$ mol, 6.9-facher molarer Überschuss) bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Freier Farbstoff wurde mittels Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa bis Durchfluss klar, 3900 rpm) sowie Dialyse über Nacht mit Markierungs-Puffer 3 mit anschließender Größenausschlusschromatografie (NGC™-Puffer 1) entfernt (Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 11.0 μM (0.31 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-8 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 0.4%, ATTO 488 0.0%.

DENV2-NS2B-NS3-WT-9

WT-9 wurde analog zu WT-8 behandelt. Die Umpufferung erfolgte jedoch in Dialyse-Puffer 2 (pH 6.7) und 0.5 mL (75.1 μM , 2.10 mg/mL, $3.7 \cdot 10^{-8}$ mol) wurden mit 40 μL ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff ($2.3 \cdot 10^{-7}$ mol, 6.1-facher molarer Überschuss) und 40 μL ATTO448-Maleimid-Farbstoff ($1.9 \cdot 10^{-7}$ mol, 5.0-facher molarer Überschuss) versetzt und inkubiert (s.o.). Der freie Farbstoff wurde mit Dialyse-Puffer 3 wie bei WT-8 beschrieben heraus gespült und das Protein mittels GPC gereinigt (NGC™-Puffer 1, Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 3.63 μM (0.10 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-9 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 0%, ATTO 488 0%.

DENV2-NS2B-NS3-WT-10

Es wurden mit Markierungs-Puffer 1 (5 x 1 mL, 3900 rpm, 5 Minuten) und Membranfilter (Vivaspin, CutOff 10 kDa) 100 μL Proteinlösung (500 μM , 14.0 mg/mL) auf einen pH Wert von 6.8 eingestellt. Anschließend wurde zu 1.0 mL Proteinlösung (12.5 μM , 0.35 mg/mL, $1.9 \cdot 10^{-8}$ mol) TCEP (250 μM , pH 5) hinzugegeben, 20 Minuten inkubiert und mit Markierungs-Puffer 1 (pH 6.8, 5 x 2 mL, Vivaspin, CutOff 10 kDa, 3900 rpm, 10 Minuten) wieder entfernt. 40 μL ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff ($2.3 \cdot 10^{-7}$ mol, 9.2-facher molarer Überschuss) und 40 μL ATTO 448-Maleimid-Farbstoff ($1.9 \cdot 10^{-7}$ mol, 7.5-facher molarer Überschuss) wurden zu 2 mL Proteinlösung (12.5 μM , 0.35 mg/mL, $2.5 \cdot 10^{-8}$ mol) gegeben und inkubiert (s.o.). Die Entfernung der freien Farbstoffe erfolgte wie bei WT-8 mit Markierungs-Puffer 1 und die Reinigung erfolgte per GPC mit NGC™-Puffer 1 (Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 2.07 μM (0.06 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-10 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 23.8%, ATTO 488 12.7%.

DENV2-NS2B-NS3-WT-11

Das Zellpellet aus 2 L Hauptkultur wurde auf Eis aufgetaut und wie unter 7.2.2.2 aufgeführt behandelt. 100 mL Lyse-Puffer (pH 6.8), 100 μ L Benzamidin (1 M), 100 μ L DTT (1 M), 1.0 mL PMSF (0.1 M) sowie je eine Spatelspitze RNase, DNase und Lysozym wurden dazu gegeben und die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (5 Zyklen, 60 s, 50% Power, 10 x). Anschließend wurde 40 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (20k rpm) und der Überstand auf eine mit Wasch-Puffer 1 (pH 6.8) vorinkubierte Nickel-NTA-Säulen (4 mL Ni²⁺-NTA) aufgetragen. Die Nickel-NTA-Säule wurde mit ca. 30 mL Proteinlösung beladen. Die Proteinlösung wurde zweimal über die Nickel-NTA-Säule gegeben und anschließend mit 12 mL Wasch-Puffer 1 (pH 6.8) und zweimal mit 12 mL Wasch-Puffer 2 (pH 6.8) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte viermal mit 12 mL Elutions-Puffer (pH 6.8). Diese Fraktionen wurden im Anschluss auf 1.5 mL (1.3 mM, 35.6 mg/mL, $1.9 \cdot 10^{-7}$ mol) konzentriert (Vivaspin, CutOff 10 kDa, 3900 rpm) und mit TCEP (250 μ M, pH 5) für 20 Minuten inkubiert. Die Farbstoffreaktion erfolgte bei Raumtemperatur mit 50 μ L ATTO 647N-Maleimid-Farbstoff ($2.9 \cdot 10^{-7}$ mol, 0.15-facher molarer Überschuss) und 50 μ L ATTO 488-Maleimid-Farbstoff ($2.3 \cdot 10^{-7}$ mol, 0.12-facher molarer Überschuss). Über Membranfilter (Vivaspin, 3900 rpm, 10 Minuten) und Dialyse (ZelluTrans) über Nacht (Markierungs-Puffer 2) wurde überschüssiger Farbstoff herausgefiltert und das Protein mittels GPC (Abschnitt 7.2.2.4) gereinigt (NGC™-Puffer 1).

Ausbeute: 89.3 μ M (2.50 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-11 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 1.5%, ATTO 488 1.4%.

DENV2-NS2B-NS3-WT-12

Die Proteinlösung (100 μ L, 500 μ M, 14.0 mg/mL, $5.0 \cdot 10^{-8}$ mol) wurde mit NGC™-Puffer 1 (pH 8) auf ein Volumen von 1.0 mL verdünnt, mit TCEP (250 μ M, pH 5) versetzt und 20 Minuten inkubiert. Die Farbstoffreaktion erfolgte mit 50 μ L ATTO 647N-Iodacetamid-Farbstoff ($2.6 \cdot 10^{-7}$ mol, 5.2-facher molarer Überschuss) sowie ATTO 488-Iodacetamid-Farbstoff ($2.7 \cdot 10^{-7}$ mol, 5.4-facher molarer Überschuss) für vier Stunden bei Raumtemperatur. Freier Farbstoff wurde mittels NGC™-Puffer 1

herausgefiltert (siehe WT-8) und die Proteinlösung über GPC gereinigt (NGC™-Puffer 1, Abschnitt 7.2.2.4).

Ausbeute: 6.28 μM (0.18 mg/mL) DENV2-NS2B-NS3-WT-12 + Farbstoff mit His₆-Tag.

DOL: ATTO 647N 0%, ATTO 488 0%.

8 Fluorimetrischer Assay

Die verwendeten Geräte und Materialien sind unter 5 und 7.1 aufgeführt. In einem fluorimetrischen Assay mit 96 Well Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One) wurden am Infinite F200 PRO der Firma TECAN mit Mikrotiterplatte-Leseinheit sowohl die K_M als auch die IC_{50} -Werte bestimmt. Die allgemeinen Bedingungen sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen. Die Auswertungen erfolgten mit dem Programm GraFit 5.0.13.

Tabelle 8.1: Bedingungen des fluorimetrischen Assay.

Substrat	Boc-Gly-Arg-Arg-7-amino-4-methylcumarin HCl (Mr = 644.73 g/mol)
Probelösung pro Well	180 μ L Assay-Puffer, 10.0 μ L Inhibitor (20 μ M) bzw. DMSO, 5.00 μ L Enzym (60–125 nm), 5.00 μ L Substrat (100 μ M)
Detektion	Ex.: 380 nm, Em.: 460 nm
Temperatur	\emptyset 25 °C
Verstärkung	65

8.1 Bestimmung der K_M -Werte

Für die Bestimmung des K_M -Wertes wurden Substratkonzentrationen von 25–1000 μ M eingesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen mit mindestens sieben Datenpunkten durchgeführt. Die Messung erfolgte über 20 Minuten (41 Zyklen á 30 Sekunden) und die Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) über einen nicht-linearen Fit (**Formel 8.1**) über die ersten 10 Minuten der Messung.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \mathbf{8.1}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

S = Substratkonzentration

K_M = Michaelis-Menten-Konstante (Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit)

8.2 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Das Screening potenzieller Inhibitoren erfolgte in einer Doppelbestimmung bei einer Konzentration von 20 μ M. Die Reinheit der Substanzen wurde anhand des

UV-Spektrums nach HPLC-MS-Analyse bestimmt und beträgt jeweils $\geq 95\%$. Der IC_{50} -Wert an der DENV2-NS2B-NS3-Protease wurde bei prozentualen Hemmungen größer 30% und an der ZIKV-NS2B-NS3-Protease bei prozentualen Hemmungen größer 50% experimentell ermittelt. DENV2 wurde, wenn möglich, in Endkonzentrationen von 125 nM und ZIKV von 25 nM verwendet. Die Verdünnungsreihen der Inhibitoren wurden in reinem DMSO hergestellt und in Konzentrationen zwischen 0.05–300 μM hergestellt. Es wurden je drei Doppelbestimmungen durchgeführt und mindestens sieben (ggf. 8–10) Datenpunkte (Inhibitorkonzentrationen) zur Auswertung nach **Formel 8.2** herangezogen.^[177]

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} + y_{\min} \quad \mathbf{8.2}$$

y = Substrathydrolysegeschwindigkeit [dF/min]

y_{\max} = Maximum der Dosis-Wirkungs-Kurve

y_{\min} = Minimum der Dosis-Wirkungs-Kurve

s = Steigung (Hill-Koeffizient)

I = Inhibitorkonzentration

IC_{50} = Inhibitorkonzentration, bei der die Enzymaktivität halbmaximal ist

8.3 Bestimmung des Korrekturfaktors

Der Korrekturfaktor wurde ohne Protease mit reinem 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) mit der entsprechenden fluoreszenzbeeinflussenden Substanz bestimmt. In einer Doppelbestimmung wurden pro Well jeweils 185 μL Assay-Puffer, 10.0 μL DMSO (Kontrolle) bzw. Substanz und 5.00 μL AMC (1 μM) vermessen (Ex.: 380 nm, Em.: 460 nm, 25 °C).

$$Faktor = \frac{\emptyset_{fluo.Substanz}}{\emptyset_{fluo.DMSO}} \quad \mathbf{8.3}$$

9 Synthetischer Teil

9.1 Allgemeine Methoden und Messgeräte

9.1.1 Lösemittel und Chemikalien

Die verwendeten Lösemittel und Chemikalien wurden von kommerziellen Anbietern bezogen und sofern nicht anders angegeben in dieser Form eingesetzt. Trockenes Dichlormethan, THF und DMF wurden über Molekularsieb gelagert. Lösemittel für die analytische und präparative HPLC sowie für die LC-MS wurden von der Firma *Fisher Scientific* bezogen. Entionisiertes Wasser wurde mit einer Ultrapure (Type 1) *Water Direct-Q®5* UV Anlage (*Merck Millipore*) erzeugt. Das Entfernen von Lösemitteln unter vermindertem Druck erfolgte mit einer Membranpumpe (Vakuumpumpe V-700, der Firma *Büchi*) bei einer durchschnittlichen Wasserbadtemperatur von 40 °C. Ethylacetat, Cyclohexan und Methanol wurden vor der Verwendung als Laufmittel zur Säulenchromatographie destillativ gereinigt. Feststoffe wurden zur Entfernung von Lösemittelrückständen mit Hilfe einer Ölpumpe im Feinvakuum getrocknet. Reaktionen unter Luftausschluss wurden in ausgeheizten Gefäßen und unter Schutzgas (Argon) durchgeführt.

9.1.2 Chromatographie

9.1.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die Reaktionskontrolle wurde mit Kieselgel beschichteten Aluminiumplatten (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ und ALUGRAM® RP-18W/UV₂₅₄) der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Substanzflecken wurden durch UV-Licht ($\lambda = 254$ nm, $\lambda = 365$ nm, CAMAG-Cabinet II) oder durch Anfärben mit entsprechendem Tauchreagenz (vgl. **Tabelle 9.1**) visualisiert. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte mit einem Heißluftgebläse. Die Laufmittelzusammensetzung ist jeweils als Volumenverhältnis angegeben.

Tabelle 9.1: Zusammensetzung der Tauchreagenzien.

Tauchreagenz	Zusammensetzung
Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz	0.5 mg Vanillin, 1 mL konz. Schwefelsäure, 50 mL Ethanol
Ninhydrin-Reagenz	0.15 g Ninhydrin, 47.5 mL Isopropanol, 2.5 mL Essigsäure
Ellmanns-Reagenz	1% 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), Wasser/Methanol 1:1, 2.5% Ammoniak
2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz	4 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 100 mL Ethanol, 40 mL Wasser, 250 mL konz. Schwefelsäure
Ehrlich-Reagenz	0.5 mg Dimethylaminobenzaldehyd, 25 mL Salzsäure, 25 mL Ethanol
Bromkresolgrün-Reagenz	0.05 g Bromkresolgrün, 0.15 mL 2 N NaOH, 250 mL Isopropanol

9.1.2.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

Für die Reinigung geringer Substanzmengen wurden mit Kieselgel beschichtete RP-18 F_{254S} Glasplatten der Firma *Merck* verwendet. Die Substanz wurde in einem geeigneten Lösemittelgemisch aus Wasser und Acetonitril gelöst und mit einer Glaskapillare in ca. 1 cm Abstand aufgetragen. Nach der Trennung wurde der Substanzfleck von der Glasplatte mit einem Spatel abgetragen und die Substanz in einem passenden Lösemittel vom Trägermaterial abgelöst. Die Lösung wurde über einen Spritzenfilter (13 mm Syringe Filter, PTFE 0.2 µm) zusätzlich filtriert.

9.1.2.3 Säulenchromatographie

Für die chromatographische Reinigung von Rohprodukten wurde Kieselgel 60M (0.04–0.063 mm) der Firma *Macherey-Nagel* sowie Kieselgel 60M (0.015–0.04 mm) der Firma *Merck* im entsprechenden Laufmittelgemisch aufgeschlämmt und ein dem Trennproblem angepasstes Chromatographierohr befüllt. Die Laufmittelverhältnisse sind als Volumenverhältnisse angegeben.

9.1.2.4 Analytische HPLC

Mit der HPLC-Anlage VARIAN ProStar mit Pumpensystem und integrierten UV/VIS Detektor 325 der Firma *AlphaCrom* wurden analytische HPLC-Proben

untersucht. Eine Eclipse XDB-C₁₈-Säule (5 μ m, 4.6 x 150 mm) der Firma *Agilent* diente als analytische Säule. Die Flussrate betrug 1–1.5 mL/min.

9.1.2.5 Präparative HPLC

Die HPLC-Anlage VARIAN ProStar wurde ebenfalls als präparative HPLC eingesetzt. Eine XDB-C₁₈-Säule (5 mm, 21.2 x 150 mm) der Firma *Agilent* wurde als stationäre Phase zur Trennung der Substanzgemische eingesetzt. Wasser-Acetonitril-Gemische wurden als mobile Phase mit einer Flussrate von durchschnittlich 20 mL verwendet. Die Probeninjektion über eine 10 mL Probenschleife erfolgte manuell.

9.1.3 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an einem Kernresonanz-Spektrometer *Fourier 300* (Avance III HD 300) der Firma *Bruker* aufgenommen. Neben ¹H-(300 MHz) und ¹³C-(75 MHz) Spektren wurden DEPT-, COSY-, HSQC- sowie HMBC-Experimente für die 2D-Analytik durchgeführt. Bezogen auf die Signale der deuterierten Lösemittel (siehe **Tabelle 9.2**) der Firma *Deutero* wurden die chemischen Verschiebungen δ in ppm relativ zum Standard TMS ($\delta = 0$ ppm) angegeben. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit dem Programm *MestReNova* (Version x64-12.0.0-20080) des Unternehmens *MestreLab Research*.

Tabelle 9.2: Chemische Verschiebung des internen Standards.

Lösemittel	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
Chloroform- <i>d</i> ₃	7.26	77.16
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆	2.50	39.52

9.1.4 Massenspektrometrie

Die HPLC-ESI-Massenspektren wurden an einer *HP Agilent 1100 Series HPLC*-Anlage mit eingebauten binären Pumpensystem, einem integrierten UV-Diodenarraydetektor sowie Autosampler gemessen. Verwendet wurde eine *Agilent* Poroshell 120 EC-C₁₈-Säule (Durchmesser: 2.10 mm, Länge: 150 mm, Partikelgröße: 4 μ m) bei einer Temperatur von 40 °C. Die Proben wurden in Methanol gelöst ($c \sim 0.1$ mg/mL) und mit einem Lösemittelgemisch aus Wasser (+ 0.1% Ameisensäure) und Acetonitril bei Flussraten von 0.5–0.7 mL/min vermessen. Die Auswertung der UV-Chromatogramme

sowie der Massenspektren erfolgte mit dem Programm *MestReNova* (Version 12.0.0-20080) des Unternehmens *MestreLab Research*.

9.1.5 Infrarot-Spektroskopie

Die Aufnahmen erfolgten an einem AVATAR 330 FT-IR-Spektrometer von *ThermoNicolet* mit einer Diamant-ATR-Einheit. Die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ in $[\text{cm}^{-1}]$ wurde für intensitätsstarke und charakteristische Banden angegeben. Das Programm *Omnice* diente der Auswertung der Spektren.

9.1.6 Schmelzpunktbestimmung

Die Bestimmung der Schmelzbereiche erfolgte mit einseitig geschlossenen Glaskapillaren an einem Schmelzpunktmessgerät *KSP1N* der Firma *A.KRÜSS Optronic*.

9.1.7 Polarimetrie

Mit einem Polarimeter der Firma *A.KRÜSS Optronic* wurden die Drehwerte chiraler Verbindungen bei $\lambda = 589 \text{ nm}$ und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt. Die verwendeten Lösemittel sowie die Konzentrationen (c in $\text{g}/100 \text{ mL}$) werden angegeben.

9.1.8 Photochemische Reaktion

Die photochemischen Reaktionen wurden mit einer *High-Power UV-LED smart* Lampe (UV-Punktlichtquelle) der Firma *Opsytec Dr. Gröbel GmbH* in einer Quarzküvette *QS High Percision Cell* der Firma *Hellma®Analytics* durchgeführt. Verwendet wurde die „Standard-Optik“ mit einer Wellenlänge von $\lambda = 365 \text{ nm}$ (UV-A und blaues Licht) und einer Leistung von 5 W . Der Abstand zwischen der Strahlungsquelle und der zu bestrahlenden Probe betrug 2 cm oder 5 cm . Die Intensität der Strahlungen wurde je nach Probe variiert (10%, 30%, 100%) und die Messungen wurden in Methanol oder Assay-Puffer 2 durchgeführt.

9.2 Allgemeine synthetische Methoden

9.2.1 TBTU-Kupplungen

Amid-Kupplungen wurden nach einer Vorschrift von MARKWORTH *et al.* durchgeführt.^[140]

Das Carbonsäure-Derivat (1.00–1.81 Äq.) wurde unter Schutzgas bei 0 °C in absolutem DCM, DMF oder EA gelöst. Nach Zugabe von TBTU (1.00–1.40 Äq.), HOBt (1.00–1.44 Äq.) und DIPEA (1.47–4.10 Äq.) wurde 30 Minuten gerührt, bevor das entsprechende Amin (1.00–1.40 Äq.) hinzugegeben wurde. Nach weiteren 30 Minuten unter Eiskühlung wurde für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit H₂O terminiert und die wässrige Phase wurde mit EA oder DCM extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Extrakte mit 2 M HCl_(aq) (3 x), H₂O (1 x), ges. NaHCO_{3(aq)} (3 x), H₂O (1 x) und ges. NaCl_(aq) (1 x) gewaschen und mit NaSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde gegebenenfalls säulenchromatographisch gereinigt.

9.2.2 Entfernung der Boc-Schutzgruppe

Die *tert*-Butyl-Schutzgruppe wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von HAN *et al.* entfernt.^[178]

Die Boc-geschützte Verbindung (1.00 Äq.) wurde vorgelegt und mit HCl (4 M in 1,4-Dioxan) versetzt. Es wurde 2–3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und das Produkt mit Pentan ausgefällt, abgesaugt und mit wenig Pentan gewaschen.

9.2.3 Entfernung der Trityl-Schutzgruppe

Die Entfernung der Trityl-Schutzgruppe erfolgte in Anlehnung an BARTELS *et al.*^[179] Das Edukt (1.00 Äq.) wurde unter Schutzgas in absoluten DCM gelöst und mit TFA (8.00 Äq.) versetzt. Anschließend wurde Triisopropylsilan (2.50 Äq.) hinzuge tropft und für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dem Gemisch wurde 5%-ige NaHCO₃-Lösung zugegeben und weiter 1.5 Stunden gerührt. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert. Nach Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck erfolgte gegebenenfalls eine säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes.

9.2.4 Entfernung der Methylschutzgruppe

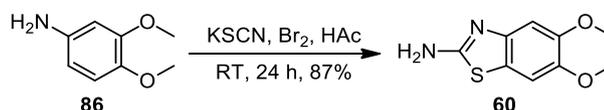
Nach FROTSCHER *et al.* wurden die Spaltung der Methylether durchgeführt.^[180]

Die Verbindung (1.00 Äq.) wurde in absolutem DCM in Argon-Atmosphäre gelöst, auf -78 °C gekühlt und BBr_3 (1 M in DCM, 3.00–10.0 Äq.) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei -78 °C und anschließend bei Raumtemperatur für 12 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit wenig MeOH oder H_2O versetzt. Ausgefallener Feststoff wurde abgesaugt oder das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Rohprodukte wurden säulenchromatographisch gereinigt.

9.3 Synthetisierte Verbindungen

9.3.1 Herstellung allgemeiner Synthesebausteine

2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (60)



In Anlehnung an eine Vorschrift von TRAPANI *et al.*^[158] wurden 3,4-Dimethoxyanilin (**86**, 5.00 g, 32.5 mmol, 1.00 Äq.) und Kaliumthiocyanat (12.7 g, 130 mmol, 4.00 Äq.) in 80 mL Eisessig aufgeschlemmt. Brom (1.67 mL, 32.6 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit 25 mL Eisessig verdünnt und über 30–45 Minuten zur Reaktionsmischung hinzugegossen. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde der entstandene Feststoff abgesaugt und mehrfach mit H₂O gewaschen. Der Filterkuchen wurde in H₂O aufgenommen, refluxiert und erneut abgesaugt. Die vereinigten Mutterlaugen wurden mit konzentriertem Ammoniak auf pH 9 eingestellt und das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt.

Ausbeute: 6.00 g (28.5 mmol, 87% (Lit. 66%)^[158]) als gelber Feststoff.

C₉H₁₀N₂O₂S (210,25 g/mol).

Schmelzbereich: 225–227 °C (H₂O), Lit.: 227 °C^[66].

DC: R_f = 0.22 (CH/Ea + NH₃ 1:2).

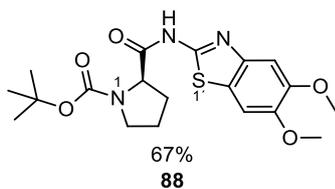
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3358, 3305, 3068, 2999, 2962, 2933, 1650, 1540, 1475, 1446, 1401, 1307, 1193, 1164, 1058, 972, 829.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.28 (s, 1H, H-7), 7.18 (s, 2H, NH₂), 6.98 (s, 1H, H-4), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 165.8 (C-2), 148.2 (C-5), 146.7 (C-6), 144.7 (C-3a), 121.84 (C-7a), 104.9 (C-7), 102.4 (C-4), 56.2 (OCH₃), 55.7 (OCH₃).

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[66,158]

(R)-tert-Butyl-2-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carboxylat (88)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von *N*-Boc-D-Prolin (**87**, 5.87 g, 27.3 mmol, 1.14 Äq.), 2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (**60**, 5.00 g, 23.8 mmol, 1.00 Äq.), TBTU (8.27 g, 25.8 mmol, 1.08 Äq.), HOBt (3.67 g, 27.2 mmol, 1.13 Äq.), DIPEA (9.00 mL, 51.7 mmol, 2.15 Äq.) und EA (180 mL).

Ausbeute: 6.58 g (16.1 mmol, 67%) als brauner Feststoff.

$C_{19}H_{25}N_3O_5S$ (407.48 g/mol).

Schmelzbereich: 155–160 °C (EA).

DC: $R_f = 0.50$ (DCM/MeOH 19:1).

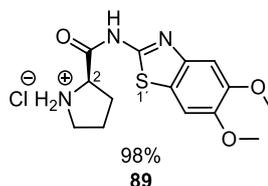
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2923, 2858, 1697, 1559, 1491, 1446, 1364, 1332, 1156.

1H -NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 12.33 (s, 1H, NH), 7.55 (s, 1H, H-7'), 7.29 (s, 1H, H-4'), 4.35–4.45 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.36–3.48 (m, 2H, H-5), 2.20–2.24 (m, 1H, H-3^A), 1.80–1.93 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.40 (s, 3H, C(CH₃)₃^A), 1.23 (s, 6H, C(CH₃)₃^{B,C}).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 172.1 (OCNH), 156.3 (C-2'), 152.3 (COO), 148.9 (C-5'), 147.0 (C-6'), 142.6 (C-3a'), 122.9 (C-7a'), 103.8 (C-7'), 103.5 (C-4'), 78.8 (C(CH₃)₃), 59.2 (C-2), 55.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 46.5 (C-5), 30.8 (C-3), 28.1 (C(CH₃)₃^A), 27.8 (C(CH₃)₃^{B,C}), 23.5 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +85$ ($c = 1.00$, EA).

(R)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamidhydrochlorid (89)



Hergestellt nach der allgemeinen Versuchsvorschrift zur Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe (Abschnitt 9.2.2) unter Verwendung von (*R*)-*tert*-Butyl-2-((5,6-dimethoxybenzo-*[d]*thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carboxylat (**88**, 6.58 g, 16.9 mmol, 1.00 Äq.) und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 45.0 mL, 180 mmol, 10.6 Äq.).

Ausbeute: 5.68 g (16.52 mmol, 98%) als beiger Feststoff.

$C_{14}H_{18}ClN_3O_3S$ (343.83 g/mol).

Schmelzbereich: 115–120 °C (Pentan).

DC: $R_f = 0.21$ (DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3526, 3432, 2868, 2709, 1565, 1487, 1442, 1299, 1262.

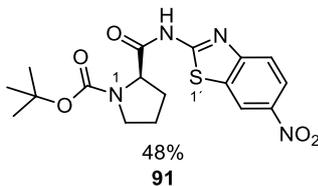
1H -NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 10.39 (s, 1H, NH_2^+), 8.90 (s, 1H, NH_2^+), 7.59 (s, 1H, H-7'), 7.33 (s, 1H, H-4'), 4.48–4.56 (m, 1H, H-2), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.22–3.32 (m, 2H, H-5), 2.37–2.46 (m, 1H, H-3^A), 1.90–2.00 (m, 3H, H-3^B, H-4).

^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 167.7 (OCNH), 155.7 (C-2'), 149.1 (C-5'), 147.3 (C-6'), 142.2 (C-3a'), 122.9 (C-7a'), 103.8 (C-7'), 103.6 (C-4'), 59.1 (C-2), 56.0 (OCH_3), 55.8 (OCH_3), 45.7 (C-5), 29.4 (C-3), 23.5 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +36$ ($c = 0.50$, EA).

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[45]

(R)-tert-Butyl-2-((6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carboxylat (91)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von *N*-Boc-D-Prolin (**87**, 1.02 g, 8.90 mmol, 1.20 Äq.), 2-Amino-6-nitrobenzo[d]thiazol (**90**, 1.52 g, 7.70 mmol, 1.00 Äq.), TBTU (2.59 g, 8.07 mmol, 1.05 Äq.), HOBt (1.16 g, 8.60 mmol, 1.12 Äq.), DIPEA (2.90 mL, 17.1 mmol, 2.20 Äq.) und DMF (30 mL).

Ausbeute: 1.44 g (3.70 mmol, 48%) als gelber Feststoff.

$C_{17}H_{20}N_4O_5S$ (392.43 g/mol).

Schmelzbereich: 95–100 °C (EA).

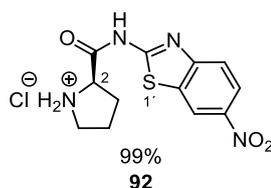
DC: $R_f = 0.78$ (DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2974, 1667, 1520, 1446, 1405, 1332, 1262, 1156, 1123, 751.

1H -NMR, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 13.00 (s, 1H, NH), 9.07 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7'), 8.26 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H, H-5'), 7.90 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4'), 4.39–4.44 (m, 1H, H-2), 3.37–3.48 (m, 2H, H-5), 2.22–2.33 (m, 1H, H-3^A), 1.82–1.69 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.39 (s, 3H, C(CH₃)₃^A), 1.23 (s, 6H, C(CH₃)₃^{B,C}).

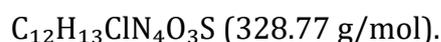
^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 173.4 (OCNH), 163.4 (C-2'), 153.5 (OC=O), 153.7 (C-3a'), 143.1 (C-6'), 132.2 (C-7a'), 121.8 (C-5'), 120.7 (C-4'), 119.2 (C-7'), 78.9 (C(CH₃)₃), 59.7 (C-2), 46.5 (C-5), 30.8 (C-3), 28.1 (C(CH₃)₃^A), 27.8 (C(CH₃)₃^{B,C}), 23.5 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +88$ ($c = 1.00$, EA).

(R)-N-(6-Nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamidhydrochlorid (92)

Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift zur Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe (Abschnitt 9.2.2) unter Verwendung von (*R*)-*tert*-Butyl-2-((6-nitrobenzo-*[d]*thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carboxylat (**91**, 1.45 g, 3.69 mmol, 1.00 Äq.) und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 7.00 mL, 28.0 mmol, 7.58 Äq.)

Ausbeute: 1.21 g (3.68 mmol, 99%) als gelber Feststoff.



Schmelzbereich: 195–198.5 °C (Pentan).

DC: $R_f = 0.25$ (DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3093, 2897, 1699, 1532, 1503, 1450, 1336, 1268, 1131.

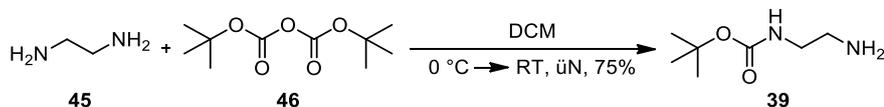
$^1\text{H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-}d_6\text{):$ δ (ppm) = 13.48 (s, 1H, OCNH), 10.34 (s, 1H, NH_2^+), 9.10 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7'), 8.96 (s, 1H, NH_2^+), 8.30 (dd, $J = 2.4, 9.0$ Hz, 1H, H-5'), 7.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4'), 4.56–4.62 (m, 1H, H-2), 3.25–3.34 (m, 2H, H-5), 2.39–2.46 (m, 1H, H-3^A), 2.02–2.13 (m, 1H, H-3^B), 1.91–2.00 (m, 2H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-}d_6\text{):$ δ (ppm) = 169.0 (O=C), 162.9 (C-2'), 153.1 (C-3a'), 143.3 (C-6'), 132.3 (C-7a'), 122.0 (C-5'), 121.0 (C-4'), 119.3 (C-7'), 59.3 (C-2), 45.8 (C-5), 29.3 (C-3), 23.5 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +16$ ($c = 0.50$, MeOH).

9.3.2 Synthese der Modellsubstanzen

tert-Butyl-N-(2-aminoethyl)carbammat (39)



Nach einer Vorschrift von RICHTER *et al.*^[138] wurde Ethylendiamin (**45**, 6.00 mL, 89.9 mmol, 9.77 Äq.) in DCM (80 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Di-*tert*-butyldicarbonat (**46**, 2.00 g, 9.20 mmol, 1.00 Äq) wurde in DCM (30 mL) gelöst und über 30 Minuten zur Reaktionslösung getropft. Es wurde eine weitere Stunde bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 3 M Na₂CO_{3(aq)} (20 mL) aufgenommen und mit DCM extrahiert (3 x 15 mL). Die organische Phase wurde mit NaSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 1.12 g (6.90 mmol, 75% (Lit.: 98%)^[138]), als farblosen Feststoff.

C₇H₁₆N₂O₂ (160.21 g/mol).

Schmelzbereich: 125–125.5 °C (PE), Lit.: 129–130 °C.^[181]

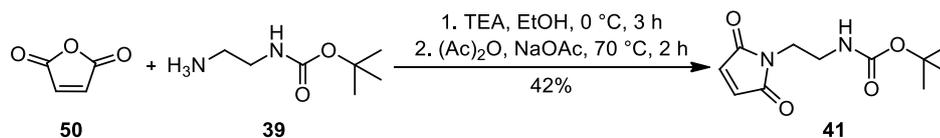
DC: R_f = 0.53 (SiO₂, DCM/MeOH 9:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3354, 2978, 2933, 1683, 1450, 1529, 1450, 1352, 1266, 1242, 1168, 1037, 988, 866, 813.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4.95 (s, 1H, OCNH), 3.15 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂), 2.78 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂), 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

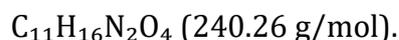
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 156.4 (OC), 79.4 (C(CH₃)₃), 43.4 (CH₂CH₂NH₂), 40.2 (CH₂CH₂NH₂), 28.5 (C(CH₃)₃).

Die analytischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[138,181]

1-((N-tert-Butoxycarbonyl)-2-aminoethyl)maleimid (41)

In Anlehnung an eine Vorschrift von RICHTER *et al.*^[138] wurden *tert*-Butyl-*N*-(2-aminoethyl)carbamate (**39**, 500 mg, 3.10 mmol, 1.00 Äq.) und TEA (0.52 mL, 3.72 mmol, 1.20 Äq.) in EtOH (50 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Maleinsäureanhydrid (**50**, 304 mg, 3.10 mmol, 1.00 Äq.) wurde in EtOH (17.5 mL) gelöst und zur Reaktionsmischung getropft. Nach 3 Stunden wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Essigsäureanhydrid (12.5 mL) aufgenommen, Natriumacetat (280 mg, 3.41 mmol, 1.10 Äq.) hinzugegeben und für 2 Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde H₂O (10 mL) zugegeben, mit EA (3 x 15 mL) extrahiert und mit gesättigter NaHCO_{3(aq)}-Lösung (2 x 15 mL) gewaschen. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PE/EA 4:1/2:1).

Ausbeute: 300 mg (1.25 mmol, 42% (Lit.: 48%)^[138]), als farblosen Feststoff.



Schmelzbereich: 129–129.5 °C (PE/EA), Lit.: 130–131.5 °C.^[182]

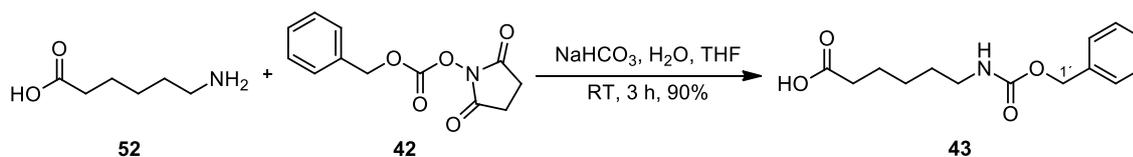
DC: $R_f = 0.64$ (SiO₂, PE/EA 1:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3354, 3085, 2974, 2929, 1679, 1699, 1511, 1434, 1283, 1254, 1160, 948, 841, 3 690.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 6.99 (s, 2H, H-3, H-4), 6.88 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 3.43 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.07 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H, NCH₂CH₂), 1.33 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 171.0 (OCNCO), 155.7 (COO), 134.5 (C-3, C-4), 77.7 (C(CH₃)₃), 38.0 (NCH₂-CH₂), 37.6 (NCH₂-CH₂), 28.2 (C(CH₃)₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[138,182]

N-Benzoyloxycarbonyl-6-aminocaprinsäure (43)

Nach einer Patentvorschrift von Voss *et al.* (Abbott)^[142] wurden 6-Aminocaprinsäure (**52**, 131 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) und NaHCO₃ (101 mg, 1.20 mmol, 1.20 Äq.) in 5 mL H₂O gelöst. Zu diesem Gemisch wurde N-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimid (**42**, 300 mg, 1.20 mmol, 1.20 Äq.) gelöst in THF (5 mL) hinzu getropft. Nach drei Stunden wurde das THF unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit 2 M HCl auf pH 2 eingestellt. Es wurde mit DCM (3 x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit NaCl_(ges.) gewaschen. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH 39:1/29:1/19:1/9:1).

Ausbeute: 240 mg (0.90 mmol, 90% (Lit.: 88%)^[183]) als farbloses Feststoff.

C₁₄H₁₉NO₄ (265.30 g/mol).

Schmelzbereich: 53–55 °C (DCM/MeOH), Lit.: 54–56 °C^[183].

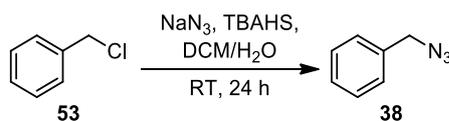
DC: R_f = 0.32 (DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3326, 2946, 2872, 1691, 1540, 1487, 1291, 1270, 1217, 1160.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.35 (s, 5H, Ar-H), 5.09 (s, 2H, H-1'), 4.81 (s, 1H, NH), 3.17–3.21 (m, 2H, H-6), 2.34 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H-2), 1.61–1.67 (m, 2H, H-3), 1.50–1.55 (m, 2H, H-5), 1.34–1.40 (m, 2H, H-4).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 179.2 (C-1), 156.6 (OCN), 136.7 (C-2'), 128.6; 128.3 (C-3'–C-7'), 66.8 (C-1'), 41.0 (C-6), 33.9 (C-2), 29.7 (C-5), 26.2 (C-4), 24.4 (C-3).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[183]

Benzylazid (44)

In Anlehnung an eine Versuchsvorschrift von ZHENG *et al.*^[143] wurden Benzylchlorid (**53**, 0.52 mL, 4.52 mmol, 1.00 Äq.), Natriumazid (1.17 g, 18.0 mmol, 4.00 Äq.) und TBAHS (153 mg, 0.45 mmol, 10 mol%) in DCM/H₂O (je 20 mL) bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Die abgetrennte wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit H₂O (3 x 40 mL) gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde wegen des potenziell explosiven Verhaltens, unter vermindertem Druck nicht vollständig entfernt.

Ausbeute: 500 mg (3.76 mmol) als farbloses Öl.

C₇H₇N₃ (133.15 g/mol).

DC: R_f = 0.78 (CH/EA 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3097, 3068, 2921, 2876, 2088, 1491, 1454, 1344, 1250, 1193, 870, 739, 694.

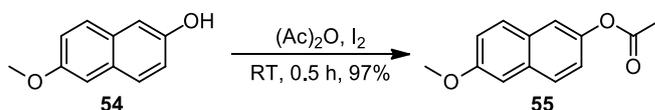
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.33–7.44 (m, 5H, Ar-H), 4.44 (s, 2H, CH₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 135.6 (C-1), 128.7/128.4 (C-2, C-3, C-5, C-6), 128.1 (C-4), 53.6 (CH₂).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[184,185]

9.3.3 Vorschriften für modifizierte Inhibitoren

2-Acetoxy-6-methoxynaphthalin (55)



In Anlehnung an eine Vorschrift von HUANG *et al.* [145] wurde 6-Methoxynaphthol (**54**, 1.50 g, 8.60 mmol, 1.00 Äq.) in Essigsäureanhydrid (45.0 mL, 476 mmol, 55.4 Äq.) gelöst und mit Iod (350 mg, 1.38 mmol, 0.16 Äq.) versetzt. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit wässriger Na₂S₂O₃-Lösung terminiert und NaHCO₃ bis zur vollständigen Zersetzung (über Nacht) von Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. NaHCO_{3(aq)} (2 x 30 mL) und H₂O (30 mL) gewaschen, mit NaSO₄ getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt.

Ausbeute: 1.80 g (8.30 mmol, 97%), als beiger Feststoff.

C₁₃H₁₂O₃ (216.23 g/mol).

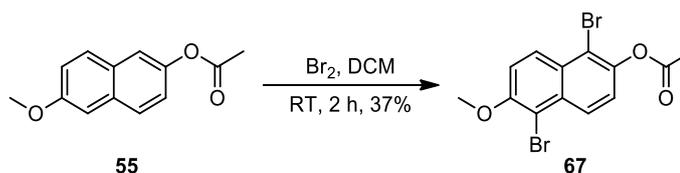
Schmelzbereich: 104–105 °C (DCM), Lit.: 106–106.5 °C.[186]

DC: R_f = 0.58 (SiO₂, CH/EA 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2970, 2933, 1748, 1601, 1503, 1385, 1356, 1192, 1143, 1115, 1009, 907, 862, 813.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.85 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-4), 7.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-8), 7.58 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-1), 7.36 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-5), 7.25 (d, *J* = 9, 2.4 Hz, 1H, H-3), 7.20 (d, *J* = 9.0 Hz, 2.4 Hz, 1H, H-7), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.0 (OC), 157.6 (C-6), 146.9 (C-2), 132.7 (C-4a), 129.4 (C-8), 129.0 (C-8a), 128.4 (C-4), 122.4 (C-3), 119.7 (C-7), 118.9 (C-1), 106.4 (C-5), 55.7 (OCH₃), 21.4 (CH₃).

1,5-Dibrom-6-methoxynaphthalin-2-yl acetat (67)

In Anlehnung an eine Vorschrift von JOHANSEN *et al.*^[146] wurde 2-Acetoxy-6-methoxynaphthalin (**55**, 305 mg, 1.41 mmol, 1.00 Äq.) in DCM (10 mL) gelöst und Brom (0.20 mL, 3.90 mmol, 2.77 Äq.), in DCM (10 mL) gelöst, hinzuge tropft. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit H₂O terminiert und die wässrige Phase mit DCM (3 x 10 mL) extrahiert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt aus 10 mL EtOH umkristallisiert.

Ausbeute: 193 mg (0.52 mmol, 37%), als beiger Feststoff.

C₁₃H₁₀Br₂O₃ (374.02 g/mol).

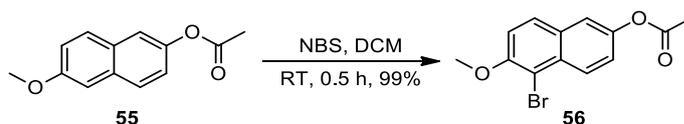
Schmelzbereich: 149–152 °C (EtOH).

DC: R_f = 0.50 (SiO₂, CH/EA 4:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2938, 1765, 1589, 1487, 1352, 1270, 1180, 1062, 1013, 874, 800.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.17–8.25 (m, 2H, H-4, H-8), 7.71 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-3), 7.55 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-7), 4.02 (s, 3H, OCH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 168.6 (COO), 154.3 (C-6), 145.1 (C-2), 131.2 (C-4a), 127.9 (C-8a), 127.6 (C-4), 126.7 (C-8), 124.4 (C-7), 116.2 (C-3), 114.5 (C-5), 107.4 (C-1), 57.1 (OCH₃), 20.7 (CH₃).

5-Brom-6-methoxynaphthalin-2-ylacetat (56)

Nach einer Patentvorschrift von GAMIL *et al.*^[148] wurde 2-Acetoxy-6-methoxynaphthalin (**55**, 2.00 g, 9.20 mmol, 1.00 Äq.) in DCM (30 mL) gelöst und *N*-Bromsuccinimid (1.60 g, 9.20 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit H₂O (15 mL) terminiert, mit Et₂O (2 x 15 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 2.70 g (9.14 mmol, 99%), als hellbrauner Feststoff.

C₁₃H₁₁BrO₃ (295.13 g/mol).

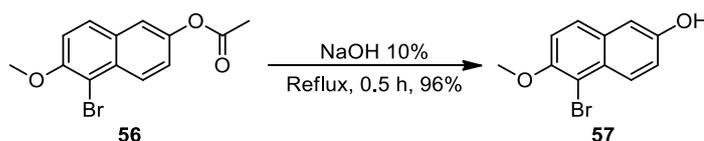
Schmelzbereich: 103–104 °C (Et₂O), Lit.: 128 °C (EtOH).^[187]

DC: R_f = 0.66 (SiO₂, CH/EA 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2970, 2938, 2840, 1744, 1708, 1601, 1495, 1454, 1356, 1270, 1201, 1131, 1058, 976, 878, 805.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.11 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-4), 8.01 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-8), 7.73 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-1), 7.57 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-7), 7.43 (dd, *J* = 9.2, 2.3 Hz, 1H, H-3), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 169.5 (COO), 153.6 (C-6), 146.9 (C-2), 130.3 (C-8a), 129.4 (C-4a), 129.0 (C-8), 126.8 (C-4), 123.8 (C-3), 119.0 (C-1), 115.1 (C-7), 106.9 (C-5), 57.0 (OCH₃), 20.9 (CH₃).

5-Brom-6-methoxy-2-naphthol (57)

In Anlehnung an eine Vorschrift von JORGENSEN *et al.*^[149] wurde 5-Brom-6-methoxy-naphthalin-2-ylacetat (**56**, 1.23 g, 4.18 mmol) mit 10% -iger NaOH-Lösung (16 mL) versetzt und 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Die abgekühlte Suspension wurde in Et₂O (20 mL) aufgenommen und mit 3 M HCl (20 mL) sauer gestellt. Die wässrige Phase wurde mit Et₂O (2 x 20 mL) extrahiert, mit NaSO₄ getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 1.01 g (3.99 mmol, 96%), als hellbrauner Feststoff.

C₁₁H₉BrO₂ (295.13 g/mol).

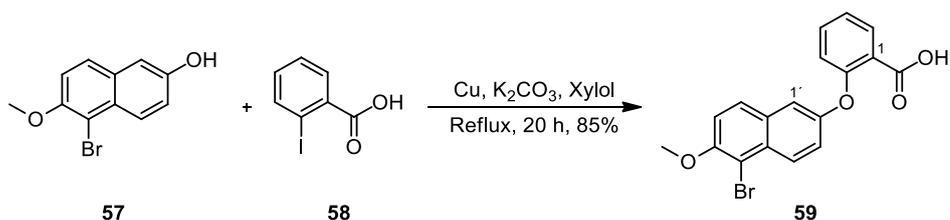
Schmelzbereich: 157–159 °C (Et₂O).

DC: R_f = 0.56 (SiO₂, CH/EA 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3326, 6052, 3036, 2978, 2938, 2835, 1610, 1565, 1503, 1450, 1336, 1262, 1136, 1062, 972, 854, 813, 796.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.78 (s, 1H, OH), 7.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-4), 7.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-8), 7.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-7), 7.20 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H, H-3), 7.15 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-1), 3.92 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 154.1 (C-2), 151.4 (C-6), 130.8 (C-8a), 127.4 (C-8), 126.9 (C-4), 126.7 (C-4a), 120.7 (C-3), 114.9 (C-7), 109.2 (C-1), 107.4 (C-5), 56.7 (OCH₃).

2-((5-Brom-6-methoxynaphthalin-2-yl)oxy)benzoesäure (59)

In Anlehnung an eine Vorschrift von YU *et al.*^[150] wurden 5-Brom-6-methoxy-2-naphthol (**57**, 940 mg, 3.19 mmol, 1.62 Äq.), 2-Iodbenzoesäure (**58**, 488 mg, 1.97 mmol, 1.00 Äq.), Kupfer (172 mg, 1.38 mmol, 1.38 Äq.) und Kaliumcarbonat (554 mg, 4.00 mmol, 2.03 Äq.) in Xylol (100 mL) gelöst und 20 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde mit H₂O (200 mL) versetzt, filtriert und die Mutterlauge mit konz. Salzsäure versetzt bis Feststoff ausfiel. Dieser wurde über Nacht bei 4 °C für eine vollständige Fällung gelagert und anschließend abgesaugt.

Ausbeute: 631 mg (1.69 mmol, 85%), als brauner Feststoff.

C₁₈H₁₃BrO₄ (373,20 g/mol).

Schmelzbereich: 195–197 °C (H₂O).

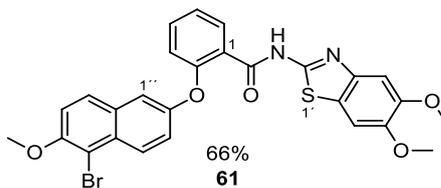
DC: R_f = 0.45 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2933, 2831, 1683, 1597, 1569, 1483, 1438, 1344, 1270, 1221, 1168, 1123, 1070, 980, 874, 784, 764.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.89 (s, 1H, COOH), 8.09 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-4'), 7.86–7.89 (m, 2H, H-6, H-8'), 7.60 (td, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H, H-4), 7.48 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-7'), 7.38 (dd, *J* = 9.3, 2.5 Hz, 1H, H-3'), 7.31 (td, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1H, H-5), 7.26 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-1'), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-3), 3.95 (s, OCH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 166.5 (COO), 154.7 (C-2), 154.3 (C-2'), 152.8 (C-6'), 133.8 (C-4), 131.6 (C-8'), 130.0 (C-8a'), 128.7 (C-6), 128.5 (C-4a'), 127.5 (C-4'), 124.6 (C-5), 124.4 (C-1), 121.4 (C-3, C-3'), 115.2 (C-7'), 112.7 (C-1'), 107.1 (C-5'), 56.0 (OCH₃).

2-((5-Brom-6-methoxynaphthalin-2-yl)oxy)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)benzamid (61)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von 2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (**60**, 474 mg, 2.25 mmol, 1.40 Äq.), 2-((5-Brom-6-methoxynaphthalin-2-yl)oxy)benzoesäure (**59**, 603 mg, 1.61 mmol, 1.00 Äq.), TBTU (725 mg, 2.25 mmol, 1.40 Äq.), DIPEA (0.40 mL, 2.42 mmol, 1.50 Äq.) und DCM (200 mL). Die Extraktion erfolgte mit DCM und die Reinigung säulenchromatographisch (SiO₂, CH/EA 1:2).

Ausbeute: 600 mg (1.06 mmol, 66%), als gelber Feststoff.

C₂₇H₂₁BrN₂O₅S (565.44 g/mol).

Schmelzbereich: 133–135 °C (DCM).

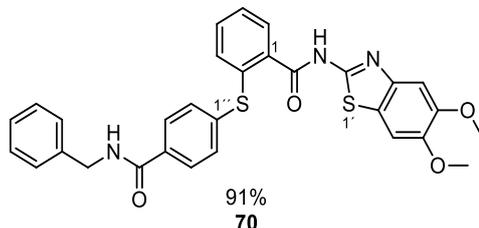
DC: R_f = 0.55 (SiO₂, CH/EA 1:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3358, 3072, 2983, 2933, 2831, 2165, 1671, 1593, 1536, 1483, 1462, 1352, 1270, 1221, 1156, 1115, 1062, 993, 976, 903, 833.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 12.41 (s, 1H, NH), 8.13 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-4''), 7.92 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-8''), 7.80 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-6), 7.49–7.59 (m, 5H, H-4, H-7', H-1'', H-3'', H-7''), 7.32 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-5), 7.29 (s, 1H, H-4'), 7.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-3), 3.97 (s, 3H, 6''-OCH₃), 3.80 (s, 6H, 5'-OCH₃, 6'-OCH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 164.4 (CONH), 154.4 (C-2), 153.2 (C-6''), 152.4 (C-2''), 149.0 (C-2', C-5'), 147.1 (C-6'), 142.2 (C-3a'), 133.0 (C-4), 130.3 (C-8a''), 129.9 (C-6), 129.4 (C-4a''), 128.7 (C-8'), 127.7 (C-4'), 123.6 (C-1), 123.0 (C-5), 122.7 (C-7a'), 122.1 (C-3'), 118.5 (C-3), 115.3 (C-1'', C-7''), 107.1 (C-5'), 103.6 (C-4', C-7'), 57.0 (6''-OCH₃), 56.0/55.7 (5'-OCH₃, 6'-OCH₃).

2-((4-(Benzylcarbamoyl)phenyl)thio)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-benzamid (70)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von 4-((2-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)phenyl)thio)benzoesäure (**69**, 250 mg, 0.54 mmol, 1.00 Äq.), Benzylamin (**38**, 80.0 μ L, 0.77 mmol, 1.43 Äq.), TBTU (230 mg, 0.72 mmol, 1.30 Äq.), DIPEA (123 μ L, 0.78 mmol, 1.44 Äq.) und DCM (10 mL). Die Reaktion wurde mit H₂O terminiert und das ausgefallene Produkt abgesaugt.

Ausbeute: 275 mg (0.49 mmol, 91%), als farbloser Feststoff.

C₃₀H₂₅N₃O₄S₂ (555.67 g/mol).

Schmelzbereich: 208.5–210.0 °C (H₂O).

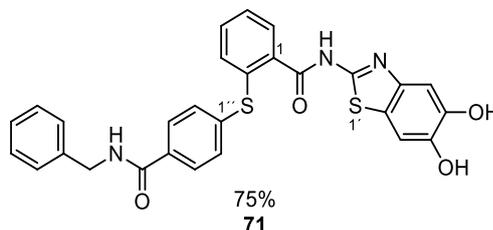
DC: R_f = 0.23 (SiO₂, CH/EA 1:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3289, 3158, 3101, 2983, 1724, 1675, 1642, 1540, 1520, 1483, 1426, 1279, 1221, 1152, 1062, 854, 825, 731.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 9.08 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH₂-NH), 7.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.77 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1H, H-2), 7.57 (s, 1H, H-4'), 7.45–7.54 (m, 2H, H-4, H-5), 7.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.2–7.35 (m, 7H, H-3, H-7', Ar-H), 4.47 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃).

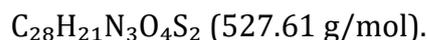
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 166.2 (CONHCH₂), 165.5 (CONH), 151.8 (C-2'), 149.0 (C-5'), 147.1 (C-6'), 141.5 (C-3a'), 139.6 (Ar-CCH₂), 138.7 (C-1''), 136.0 (C-2), 134.0 (C-4''), 133.3 (C-1), 132.0 (C-4, C-5, Ar-C), 130.7 (C-2'', C-6''), 128.9 (C-6), 128.4 (C-3'', C-5''), 128.3 (Ar-C), 127.2 (C-3, Ar-C), 126.7 (Ar-C), 122.9 (C-7a'), 103.7 (C-4', C-7'), 55.7 (OCH₃), 42.6 (CH₂).

2-((4-(Benzylcarbamoyl)phenyl)thio)-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-benzamid (71)



Die Synthese erfolgte unter Verwendung von 2-((4-(Benzylcarbamoyl)phenyl)thio)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)benzamid (**70**, 200 mg, 0.36 mmol, 1.00 Äq.), BBr_3 (1 M in DCM, 2.16 mL, 2.16 mmol, 6.00 Äq) und absolutem DCM (10 mL) nach der allgemeinen Vorschrift zur Entfernung von Methylschutzgruppen (Abschnitt 9.2.4). Das Produkt wurde nach Zugabe von H_2O (2 mL) abgesaugt.

Ausbeute: 145 mg (0.27 mmol, 75%), als gelber Feststoff.



Schmelzbereich: 229–230 °C (DCM/MeOH).

DC: $R_f = 0.20$ (SiO_2 , DCM/MeOH 19:1 + TFA).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3162, 1675, 1630, 1597, 1552, 1434, 1287, 1234, 1189, 1025, 854, 735.

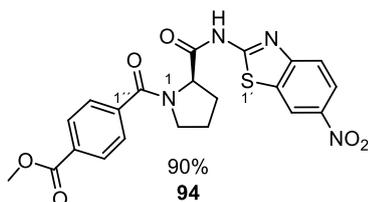
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 9.08 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 7.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.77 (dd, $J = 7.3, 1.6$ Hz, 1H, H-H-6), 7.43–7.52 (m, 2H, H-4, H-5), 7.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.21–7.35 (m, 7H, H-3, H-4', Ar-H) 7.13 (s, 1H, H-7'), 4.47 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 167.0 (CONHCH_2), 166.7 (CONH), 156.4 (C-2'), 146.1 (C-5'), 144.5 (C-6'), 142.1 (C-3'), 139.9 (Ar- CCH_2), 137.9 (C-1''), 137.1 (C-2), 133.5 (C-4'), 133.4 (C-1), 132.5 (C-4, C-5, Ar-C), 130.9 (C-2'', C-6''), 129.1 (C-6), 128.9 (C-3'', C-5''), 127.8 (Ar-C), 127.6 (C-3, Ar-C), 122.4 (C-7a'), 107.0 (C-4', C-7'), 42.2 (CH_2).

MS (ESI): m/z (%) = 528.1 (100) [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 550.1 (43) [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Reinheit: 97% ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 45:55).

(R)-Methyl 4-(2-((6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carboxyl)benzoat (94)



Nach der allgemeinen Versuchsvorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) hergestellt unter Einsatz von (*R*)-*N*-(6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamidhydrochlorid (**92**, 200 mg, 0.61 mmol, 1.00 Äq.), Monomethylterephthalat (**93**, 122 mg, 0.67 mmol, 1.10 Äq.), TBTU (215 mg, 0.67 mmol, 1.10 Äq.), HOBt (91.0 mg, 0.67 mg, 1.10 Äq.), DIPEA (0.23 mL, 1.35 mmol, 2.20 Äq.) und DMF (10 mL). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 49:1).

Ausbeute: 250 mg (0.55 mmol, 90%), als gelber Feststoff.

C₂₁H₁₈N₄O₆S (454.46 g/mol).

Schmelzbereich: 137–138 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.47 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954, 1716, 1593, 1565, 1503, 1430, 1340, 1274, 1107, 1017, 862.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.04 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, H-7'), 8.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-5'), 8.05 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.92 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-4'), 7.73 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 4.75–4.80 (m, 1H, H-2), 3.89 (s, 3H, CH₃), 3.48–3.68 (m, 2H, H-5), 2.34–2.41 (m, 1H, H-3^A), 1.88–2.06 (m, 3H, H-3^B, H-4).

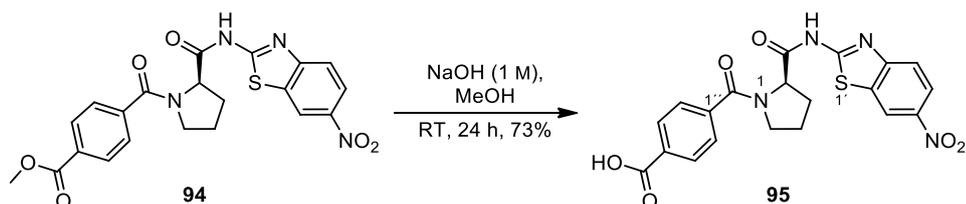
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.0 (CONH), 167.6 (CONC), 165.7 (COO), 163.5 (C-2'), 153.4 (C-3a'), 143.0 (C-6'), 140.2 (C-1''), 132.0 (C-7a'), 130.9 (C-4'), 129.2 (C-3'', C-5''), 127.6 (C-2'', C-6''), 121.8 (C-5'), 120.6 (C-4'), 119.1 (C-7'), 60.3 (C-2), 52.4 (CH₃), 49.8 (C-5), 29.4 (C-3), 25.1 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +55$ (*c* = 0.49, MeOH).

MS (ESI): *m/z* (%) = 455.2 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 96% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-4-(2-((6-Nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzoesäure (95)



In Anlehnung an eine Versuchsvorschrift von BERGERON *et al.*^[188] wurde (*R*)-Methyl 4-(2-((6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzoat (**94**, 200 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq) in MeOH (15 mL) gelöst und 1 M NaOH (2.00 mL, 2.00 mmol, 4.50 Äq.) wurde hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurde die Lösung bis zur vollständigen Ausfällung des Feststoffes mit 2 M HCl versetzt. Dieser wurde anschließend abgesaugt.

Ausbeute: 140 mg (0.32 mmol, 73%), als gelber Feststoff.

$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ (440.43 g/mol).

Schmelzbereich: 290–293 °C (MeOH).

DC: $R_f = 0.17$ (SiO₂, DCM/MeOH 9:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2893, 2492, 2455, 1695, 1638, 1532, 1503, 1442, 1409, 1340, 1295, 1266, 1131, 894, 751.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.04 (s, 1H, NH), 9.07 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-7'), 8.29 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1H, H-5'), 8.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4'), 7.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 4.75–4.79 (m, 1H, H-2), 3.48–3.68 (m, 2H, H-5), 2.34–2.40 (m, 1H, H-3^A), 1.90–2.03 (m, 3H, H-3^B, H-4).

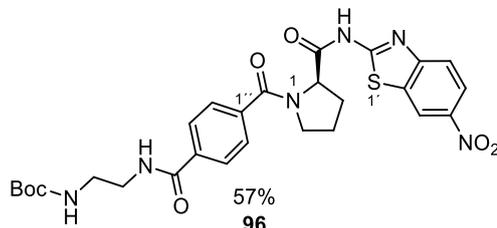
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.0 (OCNH), 167.7 (OCNC), 166.7 (COO), 163.5 (C-2'), 153.4 (C-3a'), 143.0 (C-6'), 139.8 (C-1''), 132.2 (C-7a'), 132.1 (C-4''), 129.3 (C-3'', C-5''), 127.4 (C-2'', C-6''), 121.8 (C-5'), 120.6 (C-4'), 119.1 (C-7'), 60.2 (C-2), 49.8 (C-5), 29.4 (C-3), 25.1 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +63$ ($c = 1.00$, EA).

MS (ESI): m/z (%) = 441.5 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-tert-Butyl-(2-(4-(2-((6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzamido)ethyl)carbamate (96)



Nach der allgemeine Versuchsvorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) wurden (R)-4-(2-((6-Nitrobenzo-[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzoesäure (**95**, 100 mg, 0.23 mmol, 1.10 Äq.), tert-Butyl-N-(2-aminoethyl)carbamate (**39**, 34.0 mg, 0.21 mmol, 1.00 Äq.), TBTU (75.0 mg, 0.23 mmol, 1.10 Äq.), HOBT (31.0 mg, 0.23 mmol, 1.00 Äq.), DIPEA (0.08 mL, 0.47 mmol, 2.24 Äq.) und DMF (5 mL) verwendet. Durch Zugabe von H₂O fiel das Produkt als Feststoff aus und wurde abgesaugt.

Ausbeute: 68.0 mg (0.12 mmol, 57%), als beiger Feststoff.

C₂₇H₃₀N₆O₇S (582.63 g/mol).

Schmelzbereich: 118–119 °C (H₂O).

DC: R_f = 0.24 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2970, 2929, 1691, 1605, 1540, 1417, 1340, 1266, 1160, 858, 764.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 13.00 (s, 1H, NH), 9.06 (s, 1H, H-7'), 8.58 (s, 1H, NH), 8.28 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-5'), 7.89–7.94 (m, 3H, H-4', H-3'', H-5''), 7.68 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.92 (s, 1H, NH), 4.74–4.79 (m, 1H, H-2), 3.53–3.69 (m, 2H, H-5), 3.30–3.34 (m, 2H, CH₂), 3.11–3.13 (m, 2H, CH₂), 2.33–2.40 (m, 1H, H-3^A), 1.89–2.05 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 172.2 (CONH), 167.9 (CONC), 165.7 (COO), 163.6 (C-2'), 155.8 (CONHCH₂), 153.5 (C-3a'), 143.0 (C-6'), 138.3 (C-1''), 136.0 (C-4''), 132.3 (C-7a'), 127.2 (C-2'', C-3'', C-5'', C-6''), 121.8 (C-5'), 120.6

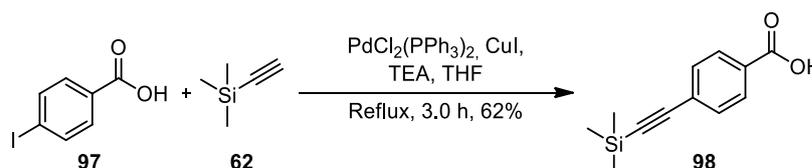
(C-4'), 119.1 (C-7'), 77.7 (C(CH₃)₃), 60.2 (C-2), 49.8 (C-5), 29.5 (C-3), 28.1 (C(CH₃)₃), 25.1 (C-4).^{bb}

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +73$ ($c = 0.36$, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 483.2 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 55:45).

4-[(Trimethylsilyl)ethynyl]benzoesäure(98)



Angelehnt an eine Vorschrift von VIVAS *et al.*^[159] wurden 4-Iodbenzoesäure (**97**, 1.00 g, 4.04 mmol, 1.00 Äq.), Trimethylsilylacetylen (**62**, 0.72 ml, 5.26 mmol, 1.30 Äq.) und Triethylamin (1.68 mL, 12.1 mmol, 3.00 Äq.) unter Argonatmosphäre in abs. THF (40 mL) vorgelegt. Anschließend wurden Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-dichlorid (142 mg, 0.20 mmol, 5.0 mol%) und Kupfer(I)iodid (77.0 mg, 0.40 mmol, 10 mol%) hinzugegeben und es wurde drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Gemisch wurde filtriert und mit Et₂O gewaschen. Die Mutterlauge wurde mit ges. NH₄Cl_(aq) (3 x 20 mL) und ges. NaCl_(aq) (1 x 20 mL) gewaschen und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, CH/EA 3:1/2:1 + 0.1% TFA) und die gesammelten Fraktionen nochmals aus Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 540 mg (2.47 mmol, 61% (Lit.: 73%)^[189]), als farblose Kristalle.

C₁₂H₁₄O₂Si (218.32 g/mol).

Schmelzbereich: 177–178 °C (CH), Lit.: 178 °C (MeOH)^[190].

DC: $R_f = 0.48$ (SiO₂, CH/EA 2:1 + TFA).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954, 2893, 2819, 2668, 2533, 2149, 1679, 1601, 1561, 1426, 1307, 1274, 1242, 1164, 956, 829, 768, 751, 657.

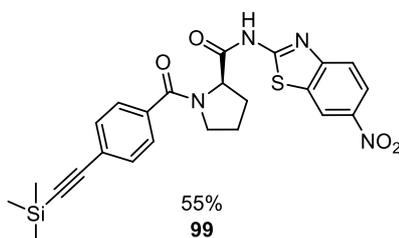
^{bb} Die Signale der beiden CH₂-Gruppen der Alkylkette können im ¹³C-NMR nicht zu geordnet werden, da diese unter dem DMSO-Signal liegen.

$^1\text{H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl}_3\text{):$ δ (ppm) = 8.05 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-3, H-5), 0.27 (s, 9H, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl}_3\text{):$ δ (ppm) = 171.6 (COOH), 132.1 (C-3, C-5), 130.1 (C-2, C-6), 128.9 (C-1, C-4), 104.1 (C \equiv CSi), 98.5 (C \equiv CSi), 0.1 (3 x CH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[189-191]

(R)-N-(6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-1-(4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (99)



Hergestellt nach der allgemeinen Synthesevorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von 4-[(Trimethylsilyl)ethynyl]benzoesäure (**98**, 99.0 mg, 0.45 mmol, 1.00 Äq.), (*R*)-*N*-(6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamid-hydrochlorid (**92**, 200 mg, 0.61 mmol, 1.35 Äq.), TBTU (198 mg, 0.62 mmol, 1.37 Äq.), HOBT (88.0 mg, 0.65 mmol, 1.44 Äq.), DIPEA 0.12 mL, 0.66 mmol, 1.47 Äq.) und DMF (8 mL). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO₂, CH/EA 3:1/2:1/1:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 120 mg (0.24 mmol, 55%), als beiger Feststoff.

C₂₄H₂₄N₄O₄SSi (492.62 g/mol).

Schmelzbereich: 257–258 °C (CH/EA).

DC: $R_f = 0.40$ (SiO₂, CH/EA 1:1 + TFA).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2958, 2880, 2161, 2026, 1695, 1601, 1552, 1516, 1442, 1336, 1254, 1176, 1131, 866, 841, 764.

$^1\text{H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-}d_6\text{):$ δ (ppm) = 13.05 (s, 1H, NH), 9.05 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-7'), 8.28 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H, H-5'), 7.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4'), 7.61 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.54 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 4.74–4.78 (m, 1H, H-2),

3.51–3.69 (m, 2H, H-5), 2.33–2.39 (m, 1H, H-3^A), 1.99–2.01 (m, 3H, H-3^B, H-4), 0.24 (s, 9H, 3x CH₃).

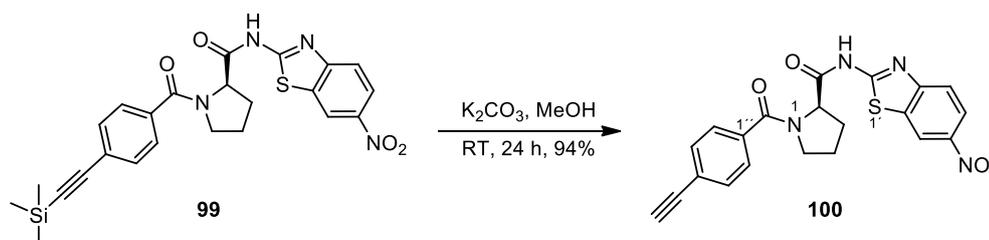
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.1 (CONH), 167.7 (CONC), 163.5 (C-2'), 153.4 (C-3a'), 143.0 (C-6'), 136.0 (C-1'), 132.2 (C-7a'), 131.5 (C-3'', C-5''), 127.7 (C-2'', C-6''), 123.9 (C-4''), 121.8 (C-5'), 120.6 (C-4'), 119.0 (C-7'), 104.4 (C \equiv CSi), 96.0 (C \equiv CSi), 60.4 (C-2), 49.9 (C-5), 29.4 (C-3), 25.2 (C-4), 0.2 (3 x CH₃).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +79$ ($c = 0.99$, CHCl₃).

MS (ESI): m/z (%) = 493.0 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 98% (H₂O/ACN 30:70).

(R)-1-(4-Ethynylbenzoyl)-N-(6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamid (100)



Angelehnt an eine Vorschrift von VIVAS *et al.*^[159] wurde (*R*)-*N*-(6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-1-(4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (**99**, 80.0 mg, 0.16 mmol, 1.00 Äq.) in MeOH (8 mL) gelöst und mit Kaliumcarbonat (33.2 mg, 0.24 mmol, 1.50 Äq.) versetzt. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit H₂O terminiert, mit EA (3 x 15 mL) extrahiert und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 65.0 mg (0.15 mmol, 94%), als gelber Feststoff.

C₂₁H₁₆N₄O₄S (420.44 g/mol).

Schmelzbereich: 146–147 °C (EA).

DC: $R_f = 0.38$ (SiO₂, PE/EA 2:1).

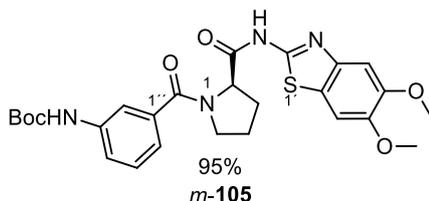
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3277, 2954, 1699, 1597, 1573, 1528, 1422, 1328, 1262, 1172, 1127, 1042, 903, 845, 756.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.64 (s, 1H, H-7'), 8.23 (d, J = 8.6 Hz 1H, H-5'), 7.76 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-4'), 7.53 (s, 4H, Ar-H), 5.02–5.06 (m, 1H, H-2), 3.60–3.65 (m, 2H, H-5), 4.74–4.78 (m, 1H, H-2), 3.19 (s, 1H, C \equiv CH), 2.45–2.57 (m, 1H, H-3^A), 2.13–2.26 (m, 2H, H-3^B, H-4^A), 1.88–1.96 (s, 1H, H-4^B).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.8 (CONH), 171.1 (CONC), 164.8 (C-2'), 153.4 (C-3a'), 144.0 (C-6'), 135.2 (C-1''), 132.7 (C-7a'), 132.3 (C-3'', C-5''), 127.6 (C-2'', C-6''), 125.0 (C-4''), 122.0 (C-5'), 121.2 (C-4'), 118.1 (C-7'), 82.7 (C \equiv CH), 79.6 (C \equiv CH), 60.7 (C-2), 50.9 (C-5), 27.7 (C-3), 25.7 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +85$ ($c = 0.66$, MeOH).

(R)-tert-Butyl-(3-(2-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamate (m-105)



Nach der allgemeinen Methode für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) wurden (R)-*N*-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamidhydrochlorid (**89**, 500 mg, 1.45 mmol, 1.40 Äq.), 3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (*m*-**64**, 246 mg, 1.04 mmol, 1.00 Äq.), TBTU (466 mg, 1.45 mmol, 1.40 Äq.), HOBt (196 mg, 1.45 mmol, 1.40 Äq.), DIPEA (0.36 mL, 2.07 mmol, 2.00 Äq.) und EA (80 mL) für die Synthese eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO₂, CH/EA 2:1/1:1/1:2/1:3).

Ausbeute: 520 mg (0.99 mmol, 95%), als farbloser Feststoff.

C₂₆H₃₀N₄O₆S (526.60 g/mol).

Schmelzbereich: 136–137 °C (CH/EA).

DC: $R_f = 0.21$ (SiO₂, CH/EA 1:2).

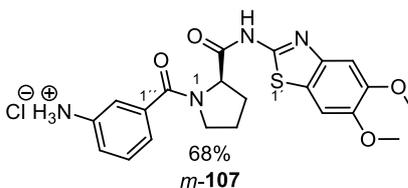
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2978, 1720, 1708, 1589, 1548, 1487, 1438, 1287, 1213, 1152, 1070, 997, 829, 743.

$^1\text{H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-}d_6\text{):$ δ (ppm) = 12.42 (s, 1H, NH), 9.52 (s, 1H, NHBoc), 7.74 (s, 1H, H-2''), 7.55 (s, 1H, H-7'), 7.49–7.52 (m, 1H, H-4'), 7.33–7.38 (m, 1H, H-5''), 7.31 (s, 1H, H-4'), 7.16 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-6''), 4.69–4.73 (m, 1H, H-2), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.48–3.66 (m, 2H, H-5), 2.26–2.36 (m, 1H, H-3^A), 1.84–2.06 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

$^{13}\text{C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-}d_6\text{):$ δ (ppm) = 171.0 (CONH), 168.2 (CONC), 167.3 (COO), 156.4 (C-2'), 148.9 (C-5'), 146.9 (C-6'), 142.5 (C-3a'), 139.5 (C-3''), 136.6 (C-1'), 128.6 (C-5''), 122.9 (C-7a'), 120.8 (C-6''), 119.6 (C-4'), 116.8 (C-2''), 103.7 (C-7'), 103.5 (C-4'), 79.3 (C(CH₃)₃), 59.9 (C-2), 55.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 50.0 (C-5), 29.6 (C-3), 28.1 (C(CH₃)₃), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +89$ ($c = 1.01$, MeOH).

(R)-3-(2-((5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzamidhydrochlorid (m-107)



Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Methode zur Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe (Abschnitt 9.2.2) unter Einsatz von (*R*)-*tert*-Butyl-(3-(2-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamate (*m-105*, 500 mg, 0.95 mmol, 1.00 Äq.) und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 13.2 mL, 52.8 mmol, 56.0 Äq.).

Ausbeute: 300 mg (0.65 mmol, 68%), als beiger Feststoff.

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}$ (462.95 g/mol).

Schmelzbereich: 163–165 °C (Dioxan).

DC: $R_f = 0.40$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2844, 2578, 2357, 1744, 1630, 1577, 1536, 1491, 1467, 1377, 1287, 1225, 1209, 1066.

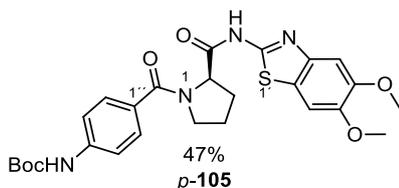
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 7.51–7.63 (m, 5H, H-7', Ar-H), 7.31 (s, 1H, H-4'), 4.74–4.78 (m, 1H, H-2), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.59–3.72 (m, 2H, H-5), 2.29–2.36 (m, 1H, H-3^A), 1.88–1.96 (m, 3H, H-3^B, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 170.8 (CONH), 167.1 (CONC), 156.4 (C-2'), 148.9 (C-5'), 147.0 (C-6'), 142.5 (C-3a'), 137.3 (C-3''), 132.4 (C-1'), 129.9 (Ar-C), 126.6 (Ar-C), 125.0 (Ar-C), 122.9 (C-7a'), 122.2 (Ar-C), 103.7 (C-7'), 103.5 (C-4'), 60.1 (C-2), 56.0 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 50.0 (C-5), 29.6 (C-3), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +77$ ($c = 1.01$, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 427.1 (100) [M - Cl + H]⁺.

(R)-tert-Butyl-(4-(2-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamate (p-105)



Hergestellt nach der allgemeinen Synthesevorschrift für TBTU-Kupplungen unter Verwendung von (R)-*N*-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamidhydrochlorid (**89**, 500 mg, 1.45 mmol, 1.40 Äq.), 4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (**p-104**, 246 mg, 1.04 mmol, 1.00 Äq.), TBTU (466 mg, 1.45 mmol, 1.40 Äq.), HOBt (196 mg, 1.45 mmol, 1.40 Äq.), DIPEA (0.72 mL, 4.14 mmol, 4.00 Äq.) und EA (80 mL). Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO₂, CH/EA 2:1/1:1/1:2/1:3).

Ausbeute: 260 mg (0.49 mmol, 47%), als beiger Feststoff.

C₂₆H₃₀N₄O₆S (526.4 g/mol).

Schmelzbereich: 168–170 °C (DCM/MeOH).

DC: $R_f = 0.47$ (SiO₂, CH/EA 1:2).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3187, 2970, 2161, 1728, 1695, 1597, 1536, 1479, 1434, 1279, 1217, 1058, 1025, 829, 756.

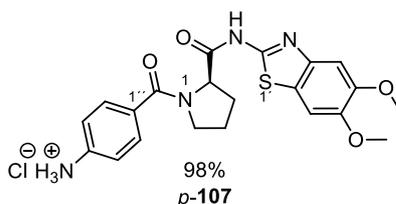
$^1\text{H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-}d_6\text{)}$: δ (ppm) = 12.38 (s, 1H, NH), 9.61 (s, 1H, NHBoc), 7.54 (s, 5H, H-7', Ar-H), 7.30 (s, 1H, H-4'), 4.69–4.73 (m, 1H, H-2), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.55–3.74 (m, 2H, H-5), 2.24–2.37 (m, 1H, H-3^A), 1.82–2.01 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

$^{13}\text{C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-}d_6\text{)}$: δ (ppm) = 171.1 (CONH), 168.0 (CONC), 168.0 (COO), 156.4 (C-2'), 148.9 (C-5'), 147.0 (C-6'), 142.6 (C-3a'), 141.5 (C-4''), 129.2 (C-1'), 128.6 (Ar-C), 122.9 (C-7a'), 117.1 (Ar-C), 103.7 (C-7'), 103.5 (C-4'), 79.5 (C(CH₃)₃), 60.2 (C-2), 56.0 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 50.1 (C-5), 29.5 (C-3), 28.1 (C(CH₃)₃), 25.3 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +55$ ($c = 1.02$, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 527.2 (100) [M + H]⁺.

(R)-4-(2-((5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidine-1-carbonyl)benzamidhydrochlorid (p-107)



Nach der allgemeinen Methode zur Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe wurden (*R*)-*tert*-Butyl-(4-(2-((5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamate (**p-105**, 230 mg, 0.44 mmol, 1.00 Äq.) und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 4.00 mL, 16 mmol, 36.4 Äq.) für die Synthese eingesetzt.

Ausbeute: 200 mg (0.43 mmol, 98%), als beiger Feststoff.

C₂₁H₂₃ClN₄O₄S (462.95 g/mol).

Schmelzbereich: 195–197 °C (Dioxan).

DC: $R_f = 0.26$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2848, 2611, 1593, 1561, 1487, 1426, 1287, 1217, 1164, 1066, 841, 760.

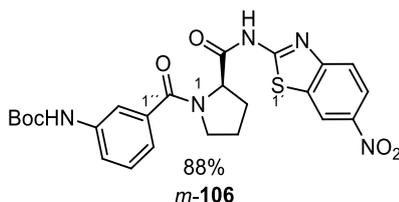
$^1\text{H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-}d_6\text{):$ δ (ppm) = 7.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.54 (s, 1H, H-7'), 7.38 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-3'', H-5'') 7.30 (s, 1H, H-4'), 4.72–4.75 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.51–3.65 (m, 2H, H-5), 2.27–2.35 (m, 1H, H-3^A), 1.85–2.00 (m, 3H, H-3^B, H-4).

$^{13}\text{C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-}d_6\text{):$ δ (ppm) = 171.0 (CONH), 167.5 (CONC), 156.4 (C-2'), 148.9 (C-5'), 142.5 (C-3a'), 135.7 (C-4''), 134.0 (C-1''), 129.0 (C-2'', C-6''), 122.9 (C-7a'), 122.0 (C-3'', C-5''), 103.7 (C-7'), 103.5 (C-4'), 60.2 (C-2), 56.0 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 50.0 (C-5), 29.6 (C-3), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +82$ ($c = 0.97$, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 427.5 (100) $[\text{M} - \text{Cl} + \text{H}]^+$.

(R)-tert-Butyl-(3-(2-((6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamate (m-106)



Unter Verwendung von (R)-N-(6-Nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamidhydrochlorid (**92**, 300 mg, 0.91 mmol, 1.00 Äq.), 3-((tert-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (*m-104*, 240 mg, 1.01 mmol, 1.11 Äq.), TBTU (305 mg, 0.95 mmol, 1.04 Äq.), HOBT (137 mg, 1.01 mmol, 1.11 Äq.), DIPEA (0.34 mL, 2.02 mmol, 2.22 Äq.) und DMF (10 mL) hergestellt nach der Versuchsvorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1). Nach Extraktion des Reaktionsgemisches war keine weitere Reinigung des Produktes erforderlich.

Ausbeute: 410 mg (0.80 mmol, 88%), als gelber Feststoff.

$\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$ (511.55 g/mol).

Schmelzbereich: 135–140 °C (EA).

DC: $R_f = 0.50$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2974, 1699, 1573, 1520, 1442, 1336, 1262, 1156, 1230.

$^1\text{H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-}d_6\text{)}$: δ (ppm) = 13.02 (s, 1H, NH), 9.51 (s, 1H, NHBoc), 9.06 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7'), 8.28 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H, H-5'), 7.91 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4'), 7.76 (s, 1H, H-2''), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-4''), 7.34 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5''), 7.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6''), 4.72–4.77 (m, 1H, H-2), 3.50–3.68 (m, 2H, H-5), 2.29–2.39 (m, 1H, H-3^A), 1.82–2.01 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

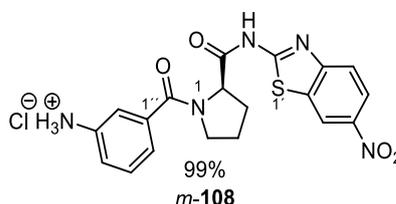
$^{13}\text{C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-}d_6\text{)}$: δ (ppm) = 172.3 (CONH), 168.4 (CONC), 168.4 (COO), 163.6 (C-2'), 153.5 (C-3a'), 143.1 (C-6'), 139.5 (C-3''), 136.4 (C-1''), 132.3 (C-7a'), 128.6 (C-5''), 121.8 (C-5'), 120.8 (C-4'), 120.6 (C-6''), 119.8 (C-4''), 119.1 (C-7'), 116.8 (C-2''), 79.3 (C(CH₃)₃), 60.2 (C-2), 50.0 (C-5), 29.5 (C-3), 28.1 (C(CH₃)₃), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +55$ ($c = 1.00$, EA).

MS (ESI): m/z (%) = 512.1 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 92% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-3-(2-((6-Nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzamidhydrochlorid (m-108)



Hergestellt nach der allgemeinen Versuchsvorschrift zur Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe (Abschnitt 9.2.2) unter Verwendung von (*R*)-*tert*-Butyl-(3-(2-((6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamat (*m*-106, 350 mg, 0.68 mmol, 1.00 Äq.) und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 6.00 mL, 24.0 mmol, 35.0 Äq.).

Ausbeute: 300 mg (0.67 mmol, 99%), als gelber Feststoff.

C₁₉H₁₈ClN₅O₄S (447.90 g/mol).

Schmelzbereich: 195–197 °C (Dioxan).

DC: $R_f = 0.28$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1 + NH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2913, 2848, 2598, 1699, 1581, 1532, 1442, 1328, 1164, 1119, 1050, 915, 751.

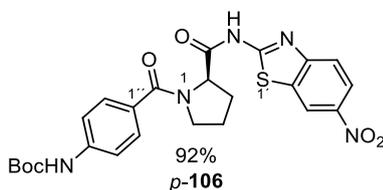
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.1 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, H-7'), 8.29 (d, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H-5'), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-4'), 7.43–7.55 (m, 4H, Ar-H), 4.76–4.80 (m, 1H, H-2), 3.58–3.68 (m, 2H, H-5), 2.34–2.40 (m, 1H, H-3^A), 1.89–2.04 (m, 3H, H-3^B, H-4).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.6 (CONH), 167.8 (CONC), 164.0 (C-2'), 153.5 (C-3a'), 143.5 (C-6'), 136.2 (C-3''), 132.7 (C-1'), 132.2 (C-7a'), 129.9 (Ar-C), 126.7 (Ar-C), 125.2 (Ar-C), 122.3 (Ar-C), 121.9 (C-5'), 120.7 (C-4'), 119.1 (C-7'), 60.8 (C-2), 50.0 (C-5), 29.5 (C-3), 25.3 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +113$ (*c* = 1.00, MeOH).

MS (ESI): *m/z* (%) = 412.2 (100) [M – Cl + H]⁺.

(*R*)-*tert*-Butyl-(4-(2-((6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamate (p-106)



Hergestellt nach der allgemeinen Versuchsvorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Einsatz von (*R*)-*N*-(6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamidhydrochlorid (**92**, 300 mg, 0.91 mmol, 1.00 Äq.), 4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure (**p-104**, 255 mg, 1.07 mmol, 1.81 Äq.), TBTU (312 mg, 0.97 mmol, 1.07 Äq.), HOBt (138 mg, 1.02 mmol, 1.12 Äq.), DIPEA (0.34 mL, 2.02 mmol, 2.22 Äq.) und DMF (7 mL). Nach Extraktion des Produktes war keine weitere Reinigung erforderlich.

Ausbeute: 430 mg (0.84 mmol, 92%), als gelber Feststoff.

C₂₄H₂₅N₅O₆S (511.55 g/mol).

Schmelzbereich: 125 °C (EA).

DC: $R_f = 0.27$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2970, 1732, 1704, 1610, 1528, 1442, 1336, 1266, 1225, 1144, 1046, 903, 854, 760.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.98 (s, 1H, NH), 9.61 (s, 1H, NHBoc), 9.06 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7'), 8.28 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H, H-5'), 7.90 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4'), 7.54 (s, 4H, Ar-H), 4.71–4.75 (m, 1H, H-2), 3.56–3.76 (m, 2H, H-5), 2.26–2.37 (m, 1H, H-3^A), 1.87–2.02 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃).

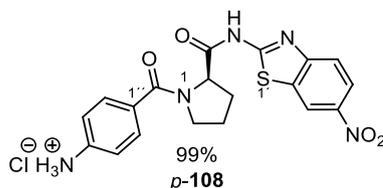
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.8 (CONH), 168.1 (CONC), 163.6 (C-2'), 162.3 (COO), 153.5 (C-3a'), 143.0 (C-6'), 141.5 (C-4'), 132.2 (C-7a'), 128.9 (C-1''), 128.5 (Ar-C), 121.7 (C-5'), 120.6 (C-4'), 119.1 (C-7'), 117.1 (Ar-C), 79.4 (C(CH₃)₃), 60.5 (C-2), 50.0 (C-5), 29.4 (C-3), 28.1 (C(CH₃)₃), 25.4 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +20$ ($c = 0.33$, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 512.0 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 98% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-4-(2-((6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzamidhydrochlorid (*p*-108)



Unter Verwendung von (*R*)-*tert*-Butyl-(3-(2-((6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbammat (*p*-106, 350 mg, 0.68 mmol, 1.00 Äq.) und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 6.00 mL, 24.0 mmol, 35.0 Äq.) hergestellt nach der allgemeinen Versuchsvorschrift zur Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe (Abschnitt 9.2.2).

Ausbeute: 300 mg (0.67 mmol, 99%), als gelber Feststoff.

C₁₉H₁₈ClN₅O₄S (447.90 g/mol).

Schmelzbereich: 196–198 °C (Dioxan).

DC: $R_f = 0.26$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1 + NH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3170, 2157, 1683, 1597, 1532, 1475, 1454, 1336, 1279, 1156, 1123, 1046, 952, 751.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.07 (s, 1H, NH), 9.06 (s, 1H, H-7'), 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5'), 7.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-4'), 7.68 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.35 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 4.75–4.79 (m, 1H, H-2), 3.58–3.72 (m, 2H, H-5), 2.34–2.38 (m, 1H, H-3^A), 1.89–2.00 (m, 3H, H-3^B, H-4).

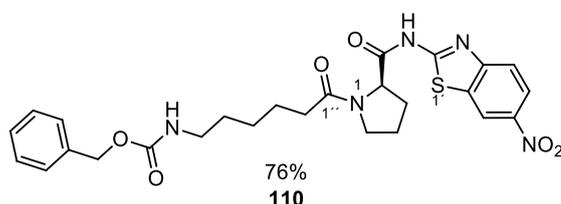
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.3 (CONH), 167.6 (CONC), 163.5 (C-2'), 153.5 (C-3a'), 143.1 (C-6'), 136.6 (C-4'), 133.2 (C-1'), 132.3 (C-7a'), 129.0 (C-2'', C-6''), 121.8 (C-5'), 121.5 (C-3'', C-5''), 120.7 (C-4'), 119.1 (C-7'), 60.4 (C-2), 50.0 (C-5), 29.5 (C-3), 25.3 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +106$ (*c* = 0.33, MeOH).

MS (ESI): *m/z* (%) = 412.1 (100) [M – Cl + H]⁺.

Reinheit: 90% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-Benzyl-(6-(2-((6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-yl)-6-oxohexyl)carbamate (110)^{cc}



Hergestellt nach der allgemeinen Versuchsvorschrift für TBTU-Kupplungen (9.2.1) unter Verwendung von (*R*)-*N*-(6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamidhydrochlorid (**92**, 112 mg, 0.34 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Benzyloxycarbonyl-6-aminocaprinsäure (**43**, 100 mg, 0.38 mmol, 1.11 Äq.), TBTU (120 mg, 0.37 mmol, 1.09 Äq.), HOBt (51.4 mg, 0.38 mmol, 1.11 Äq.), DIPEA (0.13 mL, 0.76 mmol, 2.24 Äq.) und DMF (5.0 mL). Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 49:1).

Ausbeute: 140 mg (0.26 mmol, 76%), als hellgelber Feststoff.

$C_{26}H_{29}N_5O_6S$ (539.60 g/mol).

Schmelzbereich: 55–60 °C (DCM/MeOH).

DC: $R_f = 0.27$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2933, 1695, 1622, 1587, 1528, 1438, 1332, 1262, 1160.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.85 (s, 1H, NH), 9.05 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7'), 8.28 (d, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H, H-5'), 7.89 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-4'), 7.29–7.37 (m, 5H, Ar-H), 7.22 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, NH), 5.00 (s, 2H, -OCH₂Ar), 4.56–4.59 (m, 1H, H-2), 3.50–3.64 (m, 2H, H-5), 2.98 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-6''), 2.30 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-2''), 2.16–2.25 (m, 1H, H-3^A), 1.89–2.01 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.36–1.53 (m, 4H, H-3'', H-5''), 1.22–1.32 (m, 2H, H-4').

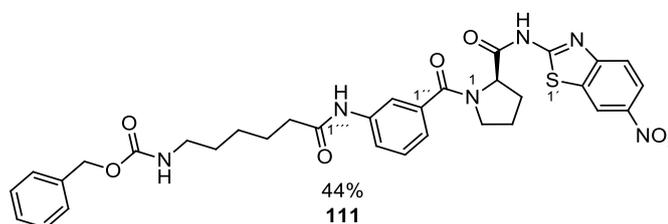
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.6 (CONH), 171.1 (C-1''), 163.5 (C-2'), 156.1 (CONHCH₂-), 153.2 (C-3a'), 143.0 (C-6'), 137.3 (Ar-CCH₂), 132.3 (C-7a'), 128.3 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 121.7 (C-5'), 120.6 (C-4'), 119.0 (C-7'), 65.1 (Ar-CCH₂), 59.4 (C-2), 46.9 (C-5), 40.2 (C-6''), 33.4 (C-2''), 29.3 (C-3, C-5''), 25.9 (C-4'), 24.6 (C-4), 23.8 (C-3').

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +83$ ($c = 1.00$, EA).

MS (ESI): m/z (%) = 540.4 (100) [M + H]⁺, 562.3 (19) [M + Na]⁺.

Reinheit: >99% (H₂O/ACN 55:45).

(*R*)-Benzyl (6-((3-(2-((6-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)amino)-6-oxohexyl)carbamate (111)^{dd}



Nach der allgemeinen Synthesevorschrift für TBTU-Kupplungen (9.2.1) wurden (*R*)-3-(2-((6-Nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzamidhydrochlorid (*m*-**108**, 153 mg, 0.34 mmol, 1.00 Äq.), *N*-Benzyloxycarbonyl-6-amino-

^{dd} Säulenchromatographie und Analytik wurden von [REDACTED] durchgeführt.

capronsäure (**43**, 100 mg, 0.38 mmol, 1.11 Äq.), TBTU (117 mg, 0.36 mmol, 1.06 Äq.), HOBT (51.4 mg, 0.38 mmol, 1.11 Äq.), DIPEA (0.13 mL, 0.76 mmol, 2.24 Äq.) und DMF (10 mL) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 49:1).

Ausbeute: 100 mg (0.15 mmol, 44%), als gelber Feststoff.

C₃₃H₃₄N₆O₇S (658.72 g/mol).

Schmelzbereich: 115–120 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.23 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3277, 2938, 1687, 1573, 1532, 1442, 1336, 1258, 1152, 1123.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.0 (s, 1H, NH), 9.06 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-7'), 8.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-5'), 7.90–7.93 (m, 2H, H-4', H-2''), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4''), 7.23–7.38 (m, 7H, H-5'', H-6'', Ar-H), 5.00 (s, 2H, -OCH₂Ar), 4.73–4.77 (m, 1H, H-2), 3.51–3.68 (m, 2H, H-5), 2.99 (q, *J* = 6.5 Hz 2H, H-6'''), 2.29–2.36 (m, 3H, H-3^A, H-2'''), 1.89–1.98 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.57–1.64 (m, 2H, H-3''), 1.39–1.48 (m, 2H, H-5''), 1.27–1.34 (m, 2H, H-4').

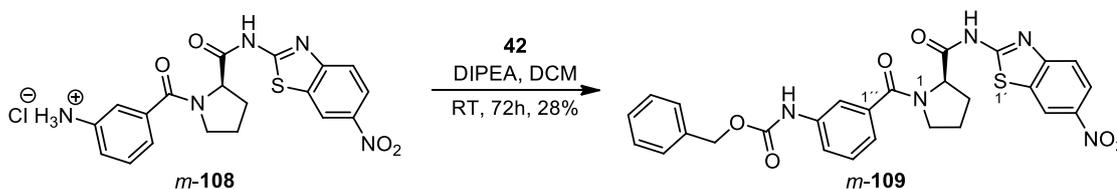
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.3 (CONH), 171.1 (C-1'), 168.3 (CONC), 163.6 (C-2'), 156.1 (CONHCH₂-), 153.5 (C-3a'), 143.0 (C-6'), 139.2 (C-3''), 137.3 (Ar-CCH₂), 136.3 (C-1''), 132.3 (C-7a'), 128.4 (Ar-C), 127.7 (Ar-C), 121.8 (C-5', C-Ar), 120.6 (C-4', C-4''), 119.1 (C-7'), 117.9 (C-2''), 65.1 (Ar-CCH₂), 60.2 (C-2), 50.0 (C-5), 40.4 (C-6'''), 36.4 (C-2'''), 29.4 (C-3, C-5'''), 26.0 (C-4'''), 25.2 (C-4), 24.8 (C-3''').

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +77$ (*c* = 1.01, MeOH).

MS (ESI): *m/z* (%) = 659.4 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 96% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-Benzyl (3-(2-((6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamate (m-109)



(R)-3-(2-((6-Nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzamidhydrochlorid (**m-108**, 60.0 mg, 0.13 mmol, 1.00 Äq.) und *N*-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimid (**42**, 41.9 mg, 0.17 mmol, 1.30 Äq.) wurden in DCM (6 mL) gelöst. Nach Zugabe von DIPEA (0.21 mL, 1.24 mmol, 9.50 Äq.) wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH 29:1).

Ausbeute: 20.0 mg (0.037 mmol, 28%), als gelber Feststoff.

C₂₇H₂₃N₅O₆S (545.57 g/mol).

Schmelzbereich: 130–131 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.50 (SiO₂, DCM/MeOH 14:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2961, 1735, 1701, 1654, 1651, 1608, 1525, 1420, 1336, 1266, 1216, 1176, 1127, 1046, 746.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.04 (s, 1H, NH), 9.94 (s, 1H, NH), 9.06 (s, 1H, H-7'), 8.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-5'), 7.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-4'), 7.76 (s, 1H, H-2''), 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4''), 7.30–7.45 (m, 6H, H-5'', Ar-H), 7.22 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-6''), 5.17 (s, 2H, -OCH₂Ar), 4.73–4.76 (m, 1H, H-2), 3.55–3.65 (m, 2H, H-5), 2.27–2.39 (m, 1H, H-3^A), 1.88–1.98 (m, 3H, H-3^B, H-4).

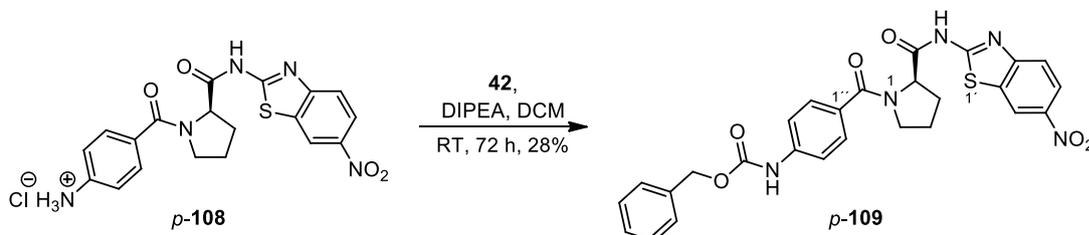
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.3 (CONH), 168.3 (CONC), 163.5 (C-2'), 153.5 (COOCH₂, C-3a'), 143.1 (C-6'), 139.1 (C-3''), 136.6 (Ar-CCH₂, C-1'), 132.3 (C-7a'), 128.8/128.5/128.2 (Ar-C, C-5''), 121.8 (C-5'), 121.3 (C-6''), 120.7 (C-4'), 119.9 (C-4''), 119.1 (C-7'), 117.0 (C-2''), 65.9 (Ar-CCH₂), 60.2 (C-2), 50.0 (C-5), 29.5 (C-3), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +40$ (*c* = 0.5, EA).

MS (ESI): m/z (%) = 546.3 (100) $[M + H]^+$.

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 45:55).

(R)-Benzyl (4-(2-((6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)phenyl)carbamate (p-109)



(R)-4-(2-((6-Nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)pyrrolidin-1-carbonyl)benzamidhydrochlorid (*p*-**108**, 60.0 mg, 0.13 mmol, 1.00 Äq.) und *N*-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimid (**42**, 41.9 mg, 0.17 mmol, 1.30 Äq.) wurden in DCM (6 mL) gelöst. Nach Zugabe von DIPEA (0.21 mL, 1.24 mmol, 9.50 Äq.) wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 29:1).

Ausbeute: 20.0 mg (0.037 mmol, 28%), als gelber Feststoff.

C₂₇H₂₃N₅O₆S (545.57 g/mol).

Schmelzbereich: 122–124 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.56 (SiO₂, DCM/MeOH 14:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3260, 3179, 2974, 2942, 1728, 1605, 1589, 1532, 1446, 1336, 1270, 1205, 1168, 1045, 903, 743.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.98 (s, 1H, NH), 10.04 (s, 1H, NH), 9.06 (s, 1H, H-7'), 8.28 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H, H-5'), 7.91 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-4'), 7.54–7.60 (m, 3H, Ar-H), 7.32–7.45 (m, 6H, Ar-H), 5.17 (s, 2H, -OCH₂Ar), 4.71–4.75 (m, 1H, H-2), 3.56–3.76 (m, 2H, H-5), 2.28–2.40 (m, 1H, H-3^A), 1.87–2.01 (m, 3H, H-3^B, H-4).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.4 (CONH), 168.0 (CONC), 163.6 (C-2'), 153.5 (COOCH₂), 153.3 (C-3a'), 143.0 (C-6'), 141.1 (C-4'), 136.4 (Ar-CCH₂), 132.2 (C-7a'), 129.4 (C-1'), 128.7/128.5/128.2/128.1 (Ar-C), 121.8 (C-5'),

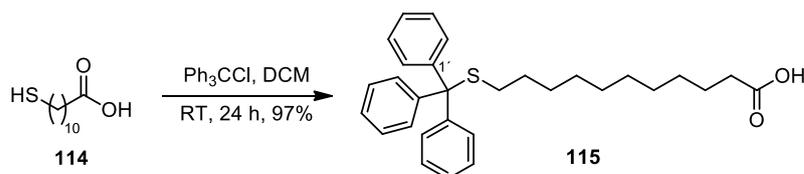
120.6 (C-4'), 119.1 (C-7'), 117.2 (Ar-C), 66.0 (Ar-CCH₂), 60.5 (C-2), 50.0 (C-5), 29.4 (C-3), 25.4 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +58$ ($c = 0.98$, EA).

MS (ESI): m/z (%) = 546.1 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 96% (H₂O/ACN 45:55).

11-((Triphenylmethyl)thio)undecansäure (115)



In Anlehnung an HORI *et. al.*^[192] wurde Triphenylmethylchlorid (638 mg, 2.29 mmol, 1.00 Äq.) in absolutem DCM (5 mL) vorgelegt. Eine Lösung von 11-Mercapto-undecansäure (**114**, 500 mg, 2.29 mmol, 1.00 Äq.) in 5 mL absolutem DCM wurde hinzugesetzt. Nach 24 Stunden wurde die Reaktionsmischung mit H₂O versetzt und mit DCM extrahiert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 1.03 g (2.23 mmol, 97%) als farbloser Feststoff.

C₃₀H₃₆O₂S (460.67 g/mol).

Schmelzbereich: 68–69 °C (DCM), Lit.: 56 °C^[193].

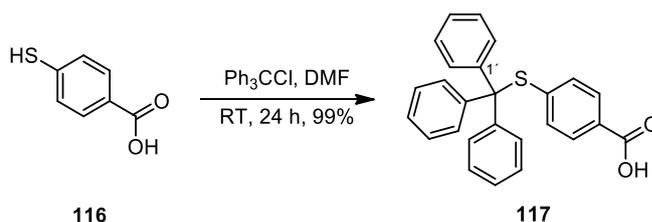
DC: $R_f = 0.45$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3069, 2915, 2840, 1670, 1590, 1481, 1436, 1286, 1232, 1187, 759, 739, 688.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.31–7.33 (m, 11H, Ar-H), 7.19–7.27 (m, 4H, Ar-H), 2.17 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-2), 2.07 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-11), 1.41–1.49 (m, 2H, H-3), 1.20–1.05 (m, 14H, 7 x CH₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 174.5 (C-1), 144.6 (C-1'), 129.1 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 126.6 (Ar-C), 66.0 (CPh₃), 33.7 (C-2), 31.2 (C-11), 28.8 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.5 (CH₂), 28.4 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.0 (CH₂), 24.5 (C-3).

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[194]

4-((Triphenylmethyl)thio)benzoesäure (117)

Nach einer Vorschrift von HORI *et al.*^[192] wurde Triphenylmethylchlorid (903 mg, 3.24 mmol, 1.00 Äq.) in absolutem DMF (6 mL) gelöst und 4-Mercaptobenzoessäure (**116**, 500 mg, 3.24 mmol, 1.00 Äq., in 5 mL DMF) wurde hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach 24 Stunden mit H₂O versetzt und der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mit H₂O gewaschen.

Ausbeute: 1.26 g (3.2 mmol, 99% (Lit. 87%)^[192]) als farbloser kristalliner Feststoff.

C₂₆H₂₀O₂S (396.50 g/mol).

Schmelzbereich: Zersetzung >220 °C (H₂O).

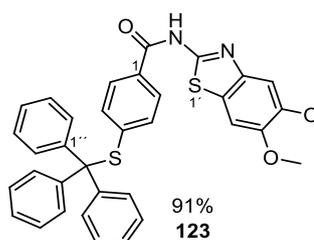
DC: R_f = 0.47 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3054, 2805, 2671, 2546, 1680, 1580, 1481, 1426, 1172, 768, 699.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.89 (s, 1H, COOH), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.25–7.33 (m, 15H, Ar-H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3, H-5).

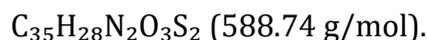
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 166.7 (COOH), 143.5 (C-1'), 140.7 (C-4), 131.2 (C-3, C-5), 129.4 (Ar-C), 128.9 (C-2, C-6), 128.0 (Ar-C), 127.1 (Ar-C), 70.6 (CPh₃).

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[192]

N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-4-(tritylthio)benzamid (123)

Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (9.2.1) unter Verwendung von 4-((Triphenylmethyl)thio)benzoesäure (**117**, 400 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.), 2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (**60**, 294 mg, 1.40 mmol, 1.40 Äq.), TBTU (450 mg, 1.4 mmol, 1.40 Äq.), DIPEA (0.26 mL, 1.50 mmol, 1.50 Äq.) und DCM (20 mL). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, CH/EA 3:1/2:1/1:1).

Ausbeute: 536 mg (0.91 mmol, 91%) als farbloser Feststoff.



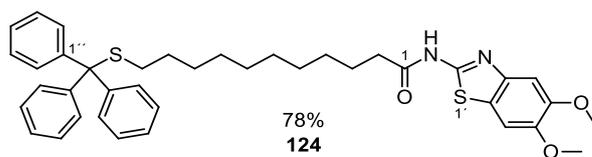
Schmelzbereich: 105–107 °C (EA).

DC: R_f = 0.39 (SiO₂, CH/EA 2:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3056, 2942, 2856, 2823, 1663, 1585, 1540, 1479, 1442, 1287, 1213, 1058, 743.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.57 (s, 1H, NH), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.56 (s, 1H, H-7'), 7.28–7.34 (m, 16H, Ar-H, H-4'), 7.03 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-3, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.82 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.0 (CONH), 158.8 (C-2'), 149.0 (C-5'), 147.1 (C-6'), 143.9 (C-3a'), 143.5 (C-1'), 140.8 (C-4), 131.0 (C-3, C-5), 129.4 (C-1, Ar-C), 128.1 (Ar-C), 127.9 (C-2, C-6, Ar-C), 127.2 (Ar-C), 122.4 (C-7a'), 103.4 (C-7'), 102.7 (C-4'), 70.5 (CPh₃), 56.0 (OCH₃), 55.7 (OCH₃).

N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-11-(tritylthio)undecanamid (124)

Synthetisiert nach der allgemeinen Versuchsvorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von 11-((Triphenylmethyl)thio)undecansäure (**115**, 461 mg, 0.90 mmol, 1.00 Äq.), 2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (**60**, 270 mg, 1.30 mmol, 1.44 Äq.), TBTU (400 mg, 1.25 mmol, 1.39 Äq.), DIPEA (0.29 mL, 1.70 mmol, 1.90 Äq.), und DCM (15 mL). Nach Extraktion bedurfte es keiner weiteren Reinigung.

Ausbeute: 450 mg (0.70 mmol, 78%) als farbloser Feststoff.

$C_{39}H_{44}N_2O_3S_2$ (652.28 g/mol).

Schmelzbereich: 59–60 °C (EA).

DC: $R_f = 0.56$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3158, 3052, 2921, 2852, 1691, 1556, 1487, 1434, 1291, 1193, 1156, 1074, 702

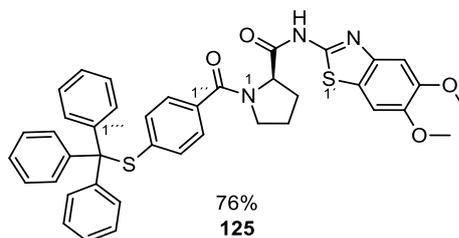
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.11 (s, 1H, NH), 7.51 (s, 1H, H-7'), 7.20–7.35 (m, 16H, H-4', Ar-H), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.44 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2), 2.06 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-11), 1.53–1.64 (m, 2H, H-3), 1.21–1.31 (m, 7H, CH₂), 1.03–1.16 (m, 7H, CH₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 171.7 (CONH), 156.4 (C-2'), 148.8 (C-5'), 146.8 (C-6'), 144.6 (C-1''), 142.5 (C-3a'), 129.1 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 126.6 (Ar-C), 122.8 (C-7a'), 103.7 (C-7''), 103.5 (C-4'), 66.0 (CPh₃), 55.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 35.0 (C-2), 31.2 (C-11), 28.7 (CH₂), 28.6 (CH₂), 26.6 (CH₂), 28.5 (CH₂), 28.3 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.0 (CH₂), 24.6 (C-3).

MS (ESI): m/z (%) = 243.1 (100) [Trityl]⁺, 675.4 (67) [M + Na]⁺.

Reinheit: >99% (H₂O/ACN 20:80).

(R)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-(tritylthio)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (125)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von 4-((Triphenylmethyl)thio)benzoesäure (**117**, 761 mg, 1.92 mmol, 1.10 Äq.), (R)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carbonsäureamidhydrochlorid (**89**, 600 mg, 1.75 mmol, 1.00 Äq.), TBTU (616 mg, 1.92 mmol, 1.10 Äq.), HOBt (259 mg, 1.92 mmol, 1.10 Äq.), DIPEA (1.19 mL, 7.00 mmol, 4.00 Äq.), und DMF (30 mL). Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (SiO₂, CH/EA 1:2 /2:1 /3:1).

Ausbeute: 910 mg (1.33 mmol, 76%) als farbloser kristalliner Feststoff.

C₄₀H₃₅N₃O₄S₂ (685.85 g/mol).

Schmelzbereich: 138–139 °C (CH/EA).

DC: R_f = 0.44 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3052, 2966, 2942, 2827, 1728, 1695, 1618, 1597, 1540, 1483, 1430, 1287, 1160, 829, 690.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 12.37 (s, 1H, NH), 7.54 (s, 1H, H-7'), 7.17–7.27 (m, 18H, Ar-H, H-2'', H-6'', H-4'), 6.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 4.63–4.67 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.39–3.53 (m, 2H, H-5), 2.25–2.34 (m, 1H, H-3^A), 1.80–1.95 (m, 3H, H-3^B, H-4).

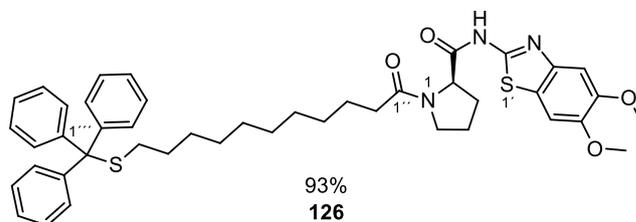
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 170.9 (CONH), 167.6 (CONC), 156.4 (C-2'), 148.9 (C-5'), 147.0 (C-6'), 143.8 (C-3a'), 142.5 (C-1'''), 136.7 (C-1''), 134.8 (C-4'), 132.5 (C-3'', C-5''), 129.5 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 127.2 (Ar-C), 127.0 (Ar-C), 122.9 (C-7a'), 103.7 (C-4'), 103.5 (C-7'), 70.7 (CPh₃), 60.1 (C-2), 55.9 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 49.9 (C-5), 29.6 (C-3), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +44$ (*c* = 0.34, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 686.3 (100) $[M + H]^+$.

Reinheit: >99% (H₂O/ACN 30:70).

(R)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(11-(tritylthio)undecanoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (126)



Synthetisiert nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von 11-((Triphenylmethyl)thio)undecansäure (**115**, 884 mg, 1.92 mmol, 1.10 Äq.), (R)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carbonsäureamidhydrochlorid (**89**, 600 mg, 1.75 mmol, 1.00 Äq.), TBTU (616 mg, 1.92 mmol, 1.10 Äq.), HOBt (259 mg, 1.92 mmol, 1.10 Äq.), DIPEA (1.19 mL, 7.00 mmol, 4.00 Äq.), und DMF (30 mL). Es bedurfte nach Extraktion keiner weiteren Reinigung.

Ausbeute: 1.23 g (1.63 mmol, 93%) als farbloser Feststoff.

$C_{44}H_{51}N_3O_4S_2$ (750.02 g/mol).

Schmelzbereich: 72–73 °C (EA).

DC: R_f = 0.24 (SiO₂, CH/EA 1:2).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3158, 3056, 2921, 2848, 1695, 1610, 1548, 1487, 1430, 1284, 1168, 1062, 833, 702.

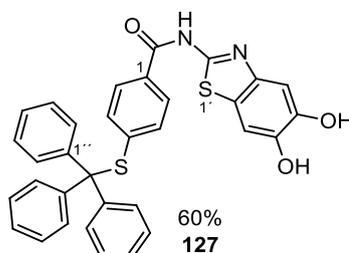
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.14 (s, 1H, NH), 7.38 (s, 1H, H-4'), 7.17–7.32 (m, 16H, H-7', Ar-H), 4.57–4.63 (m, 1H, H-2), 3.82 (s, 6H, OCH₃), 3.49–3.66 (m, 2H, H-5), 2.24–2.32 (m, 2H, H-2''), 2.13–2.20 (m, 1H, H-3^A), 1.86–2.06 (m, 5H, H-11'', H-3^B, H-4), 1.48–1.55 (m, 2H, H-3'''), 1.00–1.32 (m, 14H, H-4''–H-10'').

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 171.0 (COCH₂), 170.9 (CONH), 156.3 (C-2'), 148.7 (C-5'), 146.8 (C-6'), 144.5 (C-1'''), 142.5 (C-3a'), 129.0 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 126.2 (Ar-C), 123.0 (C-7a'), 103.3 (C-7'), 103.2 (C-4'), 65.8 (CPh₃), 59.1 (C-2), 55.8 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 46.8 (C-5), 33.6 (C-2''), 31.2 (C-11''), 29.2 (CH₂),

28.8 (CH₂), 28.7 (C-3), 28.6 (CH₂), 28.4 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.9(CH₂), 24.4 (C-4), 24.0 (C-3'').

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +111$ ($c = 1.02$, MeOH).

N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-4-(tritylthio)benzamid (127)



N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-4-(tritylthio)benzamid (**123**, 280 mg, 0,48 mmol, 1.00 Äq.) und BBr₃ (4.80 mL, 4.80 mmol, 10.0 Äq.) wurden wie unter Abschnitt 9.2.4 beschrieben, eingesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 49:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 160 mg (0.29 mmol, 60%) als gelber Feststoff.

C₃₃H₂₄N₂O₃S₂ (560.69 g/mol).

Schmelzbereich: 170–172 °C (EA).

DC: R_f = 0.32 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

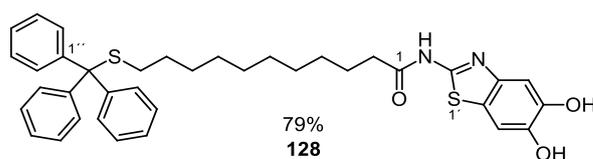
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3358, 3188, 3064, 1774, 1665, 1585, 1495, 1436, 1291, 1182, 1127, 1092, 1027, 1007, 828, 729, 694.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.25–7.34 (m, 15H, Ar-H), 7.23 (s, 1H, H-7'), 7.11 (s, 1H, H-4'), 7.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3, H-5).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.9 (CONH), 156.4 (C-2'), 145.7 (C-5'), 144.0 (C-6'), 143.5 (C-3a', C-1''), 140.6 (C-4), 131.0 (C-3, C-5), 129.5 (C-1, Ar-C), 128.1 (Ar-C), 127.9 (Ar-C), 127.2 (C-2, C-6, Ar-C), 121.8 (C-7a'), 106.4 (C-7'), 106.1 (C-4'), 70.6 (CPh₃).

MS (ESI): m/z (%) = 561.3 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 80% (H₂O/ACN (Grd.) 90:10).

N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-11-(tritylthio)undecanamid (128)

Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für die Entfernung der Methylschutzgruppen (Abschnitt 9.2.4) unter Verwendung von *N*-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-11-(tritylthio)undecanamid (**124**, 450 mg, 0.69 mmol, 1.00 Äq.) und BBr_3 (1 M in DCM, 6.90 mL, 6.90 mmol, 10.0 Äq.). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , DCM/MeOH 49:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 340 mg (0.54 mmol, 79%) als beiger Feststoff.

$\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (624.86 g/mol).

Schmelzbereich: 250 °C (DCM/MeOH).

DC: $R_f = 0.44$ (SiO_2 , DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3158, 3052, 2917, 2848, 1691, 1552, 1491, 1438, 1287, 1209, 1197, 1160, 1062, 833, 743, 698.

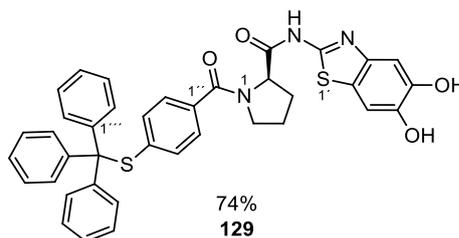
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 12.00 (s, 1H, NH), 7.22–7.32 (m, 15H, Ar-H), 7.20 (s, 1H, H-7'), 7.08 (s, 1H, H-4'), 2.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-2), 2.05 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-11), 1.51–1.65 (m, 2H, H-3), 1.01–1.29 (m, 14H, H-4–H-10).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 171.5 (CONH), 155.5 (C-2'), 145.5 (C-5'), 144.6 (C-6'), 143.7 (C-1'), 141.9 (C-3a'), 129.1 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 126.6 (Ar-C), 121.8 (C-7a'), 106.5 (C-7'), 106.3 (C-4'), 66.0 (CPh₃), 35.1 (C-2), 31.2 (C-11), 28.7 (CH₂), 28.5 (CH₂), 28.4 (CH₂), 28.3 (CH₂), 28.0 (CH₂), 24.7 (C-3).

MS (ESI): m/z (%) = 243.1 (100) [Trityl]⁺, 647.3 (35) [M + Na]⁺.

Reinheit: 97% ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 20:80).

(R)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-(tritylthio)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (129)



Die Entfernung der Methylschutzgruppen (Abschnitt 9.2.4) wurde unter Einsatz von (R)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-(tritylthio)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (**125**, 350 mg, 0.51 mmol, 1.00 Äq.) und BBr₃ (1 M in DCM, 5.10 mL, 5.10 mmol, 10.0 Äq.) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH 49:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 250 mg (0.38 mmol, 74%) als hellgelber kristalliner Feststoff.

C₃₈H₃₁N₃O₄S₂ (657.80 g/mol).

Schmelzbereich: 113–114 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.24 (SiO₂, DCM/MeOH + TFA 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3056, 2966, 2880, 2713, 2566, 1781, 1720, 1581, 1495, 1438, 1287, 1140, 1034, 837, 739, 694.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 12.22 (s, 1H, NH), 7.21–7.36 (m, 18H, Ar-H, H-2'', H-6'', H-7'), 7.10 (s, 1H, H-4'), 6.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 4.59–4.63 (m, 1H, H-2), 3.33–3.60 (m, 2H, H-5), 2.22–2.29 (m, 1H, H-3^A), 1.76–1.96 (m, 3H, H-3^B, H-4).

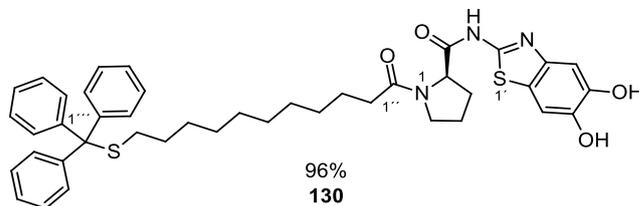
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 171.1 (CONH), 168.1 (CONC), 155.9 (C-2'), 146.0 (C-3a'), 144.3 (C-5', C-6'), 142.5 (C-1'''), 137.1 (C-4''), 135.3 (C-1''), 132.9 (C-3'', C-5''), 129.9 (Ar-C), 128.5 (Ar-C), 127.6 (Ar-C), 127.5 (Ar-C), 122.3 (C-7a'), 106.9 (C-4', C-7'), 71.1 (CPh₃), 60.6 (C-2), 50.4 (C-5), 30.0 (C-3), 25.6 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +53$ (*c* = 0.99, MeOH).

MS (ESI): *m/z* (%) = 658.2 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: >99% (H₂O/ACN 45:55).

(R)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(11-(tritylthio)undecanoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (130)



Nach der allgemeinen Vorschrift für die Entfernung von Methylschutzgruppen (Abschnitt 9.2.4) synthetisiert unter Verwendung von (*R*)-*N*-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(11-(tritylthio)undecanoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (**126**, 200 mg, 0.27 mmol, 1.00 Äq.) und BBr₃ (1 M in DCM, 2.70 mL, 2.70 mmol, 10.0 Äq.). Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 49:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 190 mg (0.26 mmol, 96%) als grauer Feststoff.

C₄₂H₄₇N₃O₄S₂ (721.97 g/mol).

Schmelzbereich: 66.5–68 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.31 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1 + TFA).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3191, 2929, 2844, 2692, 2529, 2439, 1781, 1671, 1593, 1495, 1442, 1291, 1197, 1140, 1033, 833, 727, 698.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.09 (s, 1H, NH), 7.26–7.32 (m, 16H, H-7', Ar-H), 7.10 (s, 1H, H-4'), 4.50–4.53 (m, 1H, H-2), 3.45–3.63 (m, 2H, H-5), 2.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-2''), 2.11–2.17 (m, 1H, H-3^A), 2.06 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-11'') 1.80–1.97 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.41–1.48 (m, 2H, H-3''), 1.09–1.32 (m, 14H, H-4''–H-10'').

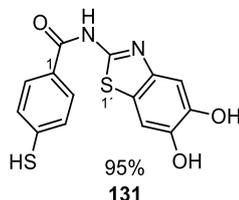
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 171.1 (CONC, CONH), 155.5 (C-2'), 145.6 (C-5'), 144.6 (C-6'), 143.9 (C-1''), 141.9 (C-3a'), 129.1 (Ar-C), 128.0 (Ar-C), 126.7 (Ar-C), 121.9 (C-7a'), 106.4 (C-4', C-7'), 66.0 (CPh₃), 59.3 (C-2), 46.9 (C-5), 33.6 (C-2''), 31.2 (C-11''), 29.4 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.4 (C-3, CH₂), 28.0 (CH₂), 24.5 (C-4), 24.0 (C-3'').

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +60$ (*c* = 1.03, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 243.2 (100) [Trityl]⁺, 744.5 (15) [M + Na]⁺.

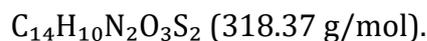
Reinheit: 99% (H₂O/ACN 20:80).

N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-4-mercaptobenzamid (131)



Nach der allgemeinen Methode zur Entfernung der Tritylschutzgruppe (Abschnitt 9.2.3) wurden *N*-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-4-(tritylthio)benzamid (**127**, 175 mg, 0.32 mmol, 1.00 Äq.), TFA (194 μ L, 2.52 mmol, 8.00 Äq.), Triisopropylsilan (161 μ L, 0.79 mmol, 2.50 Äq.) und DCM (25 mL) eingesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 49:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 97.0 mg (0.30 mmol, 95%) als hellgelber Feststoff.



Schmelzbereich: 212.5–213 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.34 (SiO₂, DCM/MeOH + TFA 19:1).

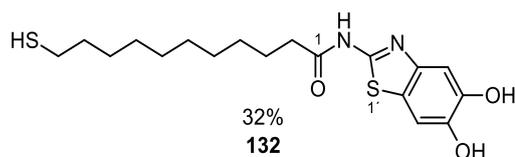
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3179, 3081, 2925, 2570, 1675, 1589, 1548, 1495, 1442, 1287, 1274, 1189, 1140, 1103, 1029, 837, 727.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.12 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H, H-3, H-), 7.25 (s, 1H, H-7'), 7.12 (s, 1H, H-4'), 4.35 (s, SH).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 163.2 (CONH), 158.6 (C-2'), 145.7 (C-5'), 144.1 (C-6'), 143.5 (C-3a'), 140.5 (C-4), 129.4 (C-1, C-2, C-6), 126.1 (C-3, C-5), 106.4 (C-4', C-7').

MS (ESI): m/z (%) = 319.1 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 84% (H₂O/ACN 65:35).

N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-11-mercaptoundecanamid (132)

Unter Verwendung von *N*-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-11-(tritylthio)undecanamid (**128**, 400 mg, 0.74 mol, 1.00 Äq.), TFA (381 μ L, 1.86 mmol, 2.50 Äq.), Triisopropylsilan (460 μ L, 5.92 mmol, 8.00 Äq.) und DCM (10 mL) hergestellt nach der allgemeinen Methode zur Entfernung der Tritylschutzgruppe (Abschnitt 9.2.3). Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH 49:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 90.0 mg (0.24 mmol, 32%) als grauer Feststoff.

C₁₈H₂₆N₂O₃S₂ (382.54 g/mol).

Schmelzbereich: 161–163 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.50 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3212, 3166, 2250, 1421, 1176.

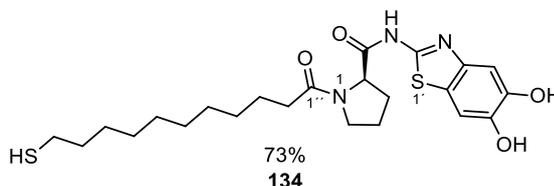
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.19 (s, 1H, H-7'), 7.07 (s, 1H, H-4'), 2.39–2.47 (m, 3H, H-2, $\frac{1}{2}$ CH₂), 2.14 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, SH), 1.56–1.62 (m, 2H, CH₂), 1.45–1.54 (m, 3H, H-11, $\frac{1}{2}$ CH₂), 1.17–1.33 (m, 12H, CH₂).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 171.6 (CONH), 155.6 (C-2'), 145.5 (C-5'), 143.8 (C-6'), 141.8 (C-3a'), 121.9 (C-7a'), 106.5 (C-7'), 106.4 (C-4'), 35.1 (C2), 33.5 (C11), 30.8 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.6 (CH₂), 27.8 (CH₂), 24.7 (CH₂), 23.8 (CH₂).

MS (ESI): *m/z* (%) = 383.2 (100) [M + H]⁺.

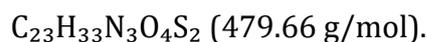
Reinheit: 95% (H₂O/ACN 35:65).

(R)-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(11-mercaptoundecanoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (134)



(R)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(11-(tritylthio)undecanoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (**130**, 350 mg, 0.48 mmol, 1.00 Äq.), TFA (296 μ L, 3.84 mmol, 8.00 Äq.), Triisopropylsilan (246 μ L, 1.20 mmol, 2.50 Äq.) und DCM (10 mL) wurden nach der allgemeinen Methode zur Entfernung der Tritylschutzgruppe (Abschnitt 9.2.3) umgesetzt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH 49:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 170 mg (0.35 mmol, 73%) als farbloser Feststoff.



Schmelzbereich: 112–113 °C (DCM/MeOH).

DC: $R_f = 0.45$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1 + TFA).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2929, 2845, 1595, 1565, 1490, 1441, 1291, 1182, 1137, 1032, 729.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.43 (s, 1H, H-7'), 7.33 (s, 1H, H-4'), 4.73–4.76 (m, 1H, H-2), 3.64–3.85 (m, 2H, H-5), 2.66–2.79 (m, 2H, H-11'), 2.35–2.39 (m, 1H, H-3^A), 2.31 (s, 1H, SH) 2.07–2.23 (m, 3H, H-3^B, H-4), 1.67–1.82 (m, 6H, CH₂), 1.34–1.53 (m, 12H, CH₂).

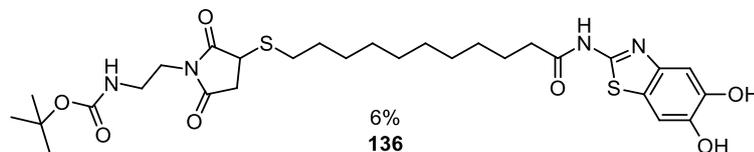
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 171.2 (CONC, CONH), 155.5 (C-2'), 145.6 (C-5'), 143.9 (C-6'), 141.9 (C-3a'), 121.9 (C-7a'), 106.5 (C-7'), 106.4 (C-4'), 59.3 (C-2), 47.0 (C-5), 33.6 (2 x CH₂), 30.8 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.0 (2 x CH₂), 28.8 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.6 (CH₂), 27.8 (CH₂), 24.6 (C-4), 24.2 (CH₂).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +115$ ($c = 1.00$, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 480.3 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 95% (H₂O/ACN 45:55).

tert-Butyl-(2-(3-((11-((5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-11-oxoundecyl)thio)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl)carbamate (136)



Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von KALIA et al.^[166]. *N*-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-11-mercaptoundecanamid (**132**, 10.0 mg, 26.1 μmol , 1.00 Äq) und 1-((*N*-tert-Butoxycarbonyl)-2-aminoethyl)maleimid (**41**, 6.28 mg, 26.1 μmol , 1.00 Äq) wurden in 2.0 mL DMF gelöst, mit TEA (0.36 μL , 2.61 μmol , 0.10 Äq) versetzt und das Reaktionsgemisch wurde für eine Woche bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Trennung erfolgte mittels präparativer HPLC (XDB-C18, ACN/H₂O, 35:65).

Ausbeute: 1.00 mg (1.61 μmol , 6%) als farbloser Feststoff.

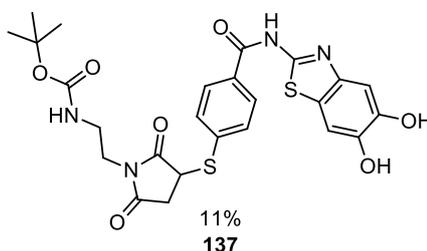
$\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$ (622.80 g/mol).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3273, 2929, 2855, 1695, 1670, 1600, 1555, 1500, 1446, 1291, 1157, 10887, 1037.

MS (ESI): m/z (%) = 623.3 (100) [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 645.2 (20) [$\text{M} + \text{Na}$]⁺.

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 55:45).^{ee}

tert-Butyl-(2-(3-((4-((5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)carbamoyl)phenyl)-thio)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl)carbamate (137)

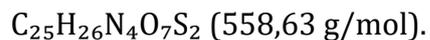


In Anlehnung an eine Vorschrift von KALIA et al.^[166] wurden *N*-(5,6-Dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-4-mercaptobenzamid (**131**, 5.00 mg, 15.7 μmol , 1.00 Äq.) und 1-((*N*-tert-Butoxycarbonyl)-2-aminoethyl)maleimid (**41**, 3.78 mg,

^{ee} Auf weitere Analytik wurde aufgrund der geringen Masse verzichtet.

15.7 μmol , 1.00 Äq.) in 1.0 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von TEA (0.22 μL , 1.57 μmol , 0.10 Äq.) wurde eine Woche bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch präparative HPLC (XDB-C18, ACN/H₂O, 30:70).

Ausbeute: 1.00 mg (1.61 μmol , 11%) als farbloser Feststoff.



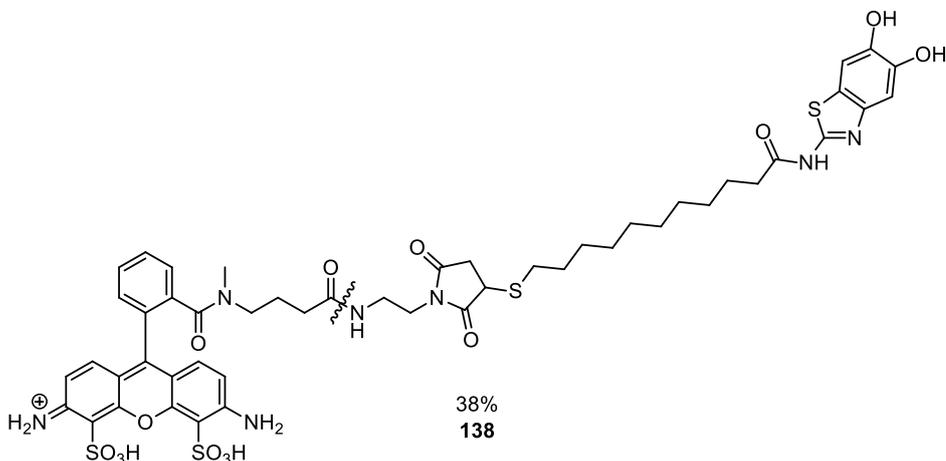
MS (ESI): m/z (%) = 559.1 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: 86% (H₂O/ACN 65:35).^{ff}

^{ff} Auf weitere Analytik wurde aufgrund der geringen Masse verzichtet.

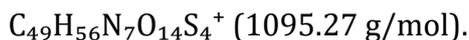
9.3.4 Vorschrift für einen fluoreszenzmarkierten Inhibitor

6-Amino-9-(2-((4-((2-(3-((11-((5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)amino)-11-oxoundecyl)thio)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl)amino)-4-oxobutyl)methyl)-carbamoyl)phenyl)-4,5-disulfo-3H-xanthen-3-iminium (138)



In Anlehnung an eine Vorschrift von KALIA *et al.*^[166] wurden ATTO 488-Maleimid (0.61 mg, 0.51 nmol, 1.00 Äq.) und *N*-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)-11-mercaptoundecanamid (**132**, 0.43 mg, 1.12 nmol, 2.00 Äq.) in absolutem DMF (300 μ L) gelöst und mit TEA (0.50 μ L, 3.56 nmol, 6.40 Äq.) versetzt. Nach 24 Stunden wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ca. 200 μ L ACN/H₂O (70:30) aufgenommen, auf eine präparative DC-Platte (RP-18) aufgetragen und mit ACN/H₂O (70:30) als Fließmittel entwickelt. Der Substanzfleck wurde mechanisch vom Aluminiumträger abgelöst und das Produkt wurde durch Rühren mit einem ACN/H₂O (70:30)-Gemisch aus der stationären Phase extrahiert (3 x 300 μ L). Das Gemisch wurde über einen Spritzenfilter gegeben und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 0.24 mg (0.21 nmol, 38%) als oranger Feststoff.



MS (ESI): m/z (%) = 1094.22 (66) [M]⁺, 546.6. (100) [M – li. Fragment + 3H + Na]⁺.

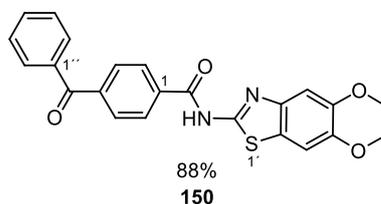
Reinheit: 97% (H₂O/ACN (Grd.) 90:10).^{gg}

^{gg} Aufgrund der geringen Substanzmenge wurde keine weitere Analytik durchgeführt.

9.3.5 Verbindungen für Photoaffinitätsmarkierungen

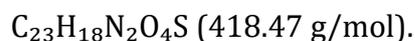
Die folgenden Reaktionen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt.

4-Benzoyl-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)benzamid (150)



Nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) wurde 4-Benzoylbenzoesäure (**148**, 238 mg, 1.05 mmol, 1.10 Äq) in EA (20 mL) gelöst, TBTU (318 mg, 0.99 mmol, 1.00 Äq.), HOBt (142 mg, 1.05 mmol, 1.10 Äq.) und DIPEA (0.36 mL, 2.10 mmol, 2.20 Äq.) sowie 2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (**60**, 300 mg, 0.95 mmol, 1.00 Äq., nach 30 Minuten) wurden hinzugegeben und die Reaktion wurde nach 72 Stunden mit H₂O beendet. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mit H₂O gewaschen.

Ausbeute: 350 mg (0.84 mmol, 88%) als gelber Feststoff.



Schmelzbereich: 228–230 °C (H₂O).

DC: $R_f = 0.49$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

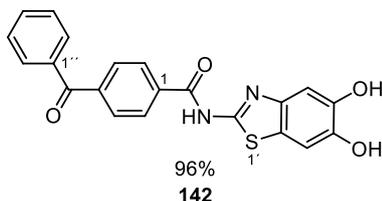
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3052, 3007, 2966, 2925, 2566, 1675, 1646, 1589, 1556, 1487, 1374, 1213, 1058.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.27 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.80–7.74 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.70 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-4''), 7.61–7.56 (m, 3H, H-3'', H-5'', H-7'), 7.32 (s, 1H, H-4'), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 195.4 (CO), 165.1 (CONH), 157.4 (C-2'), 149.1 (C-5'), 147.2 (C-6'), 142.0 (C-3a'), 140.3 (C-4), 136.5 (C-1''), 135.5 (C-1), 133.2 (C-4''), 129.8 (C-2'', C-6''), 129.6 (C-3, C-5), 128.8 (C-3'', C-5''), 128.5 (C-2, C-6), 122.9 (C-7a'), 103.7 (C-7'), 103.2 (C-4'), 56.0 (OCH₃), 55.8 (OCH₃).

MS (ESI): m/z (%) = 419.2 (100) $[M + H]^+$, 441.1 (36) $[M + Na]^+$.

4-Benzoyl-*N*-(5,6-dihydroxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)benzamid (142)



Nach der allgemeinen Vorschrift zur Entfernung von Methylschutzgruppen (Abschnitt 9.2.4) wurde 4-Benzoyl-*N*-(5,6-dimethoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)benzamid (**150**, 100 mg, 0.26 mmol, 1.00 Äq.) in 7 mL DCM gelöst und anschließend BBr_3 (1 M in DCM, 1.56 mL, 1.56 mmol, 6.00 Äq.) hinzugegeben. Der durch die Zugabe von H_2O ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und im Feinvakuum getrocknet.

Ausbeute: 100 mg (0.25 mmol, 96%) als gelber Feststoff.

$\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (390.41 g/mol).

Schmelzbereich: 230-232 °C (H_2O).

DC: $R_f = 0.33$ (SiO_2 , DCM/MeOH +TFA 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3175, 2267, 1679, 1654, 1556, 1495, 1446, 1274, 1185, 706.

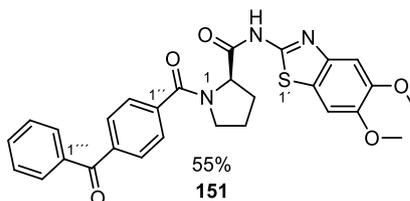
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 8.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.86 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.78 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.70 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-4'), 7.59 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.27 (s, 1H, H-7'), 7.14 (s, 1H, H-4'), 5.10 (s, 2H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 195.4 (CO), 165.2 (CONH), 157.4 (C-2'), 145.8 (C-5'), 144.2 (C-6'), 140.3 (C-4, C-3a'), 136.6 (C-1, C-1'), 133.2 (C-4''), 129.8 (C-2'', C-6''), 129.6 (C-3, C-5), 128.8 (C-3'', C-5''), 128.5 (C-2, C-6), 125.0 (C-7a'), 106.6 (C-7'), 106.0 (C-4').

MS (ESI): m/z (%) = 391.1 (100) $[M + H]^+$.

Reinheit: 98% ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 45:55).

(R)-1-(4-Benzoylbenzoyl)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamid (151)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von DMF (20 mL), 4-Benzoylbenzoesäure (**148**, 217 mg, 0.96 mmol, 1.10 Äq.), TBTU (307 mg, 0.96 mmol, 1.10 Äq.), HOBT (129 mg, 0.95 mmol, 1.10 Äq.), DIPEA (0.6 mL, 3.53 mmol, 4.00 Äq.), (R)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carbonsäureamidhydrochlorid (**89**, 300 mg, 0.87 mmol, 1.00 Äq.). Das Produkt wurde durch Zugabe von H₂O ausgefällt und abgesaugt.

Ausbeute: 250 mg (0.48 mmol, 55%) als beiger Feststoff.

C₂₈H₂₅N₃O₅S (515.58 g/mol).

Schmelzbereich: 237–240 °C (H₂O).

DC: R_f = 0.37 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3138, 3064, 2987, 2970, 2917, 2214, 1691, 1659, 1614, 1556, 1491, 1442, 1270, 1213, 1156, 1058.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 7.81–7.84 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7.74–7.78 (m, 4H, H-2'', H-6'', H-2''', H-6'''), 7.68–7.71 (m, 1H, H-4'''), 7.57–7.61 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 7.55 (s, 1H, H-7'), 7.31 (s, 1H, H-4'), 4.75–4.79 (m, 1H, H-2), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.52–3.70 (m, 2H, H-5), 2.31–2.39 (m, 1H, H-3^A), 1.92–2.00 (m, 3H, H-3^B, H-4).

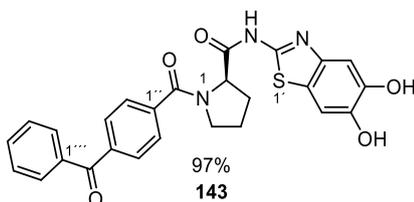
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 195.4 (CO), 170.8 (CONH), 167.6 (CONC), 156.4 (C-2'), 148.9 (C-5'), 147.0 (C-6'), 142.6 (C-3a'), 139.7 (C-4'), 138.2 (C-1'), 136.7 (C-1'''), 133.0 (C-4'''), 129.7 (C-3'', C-5''), 129.6 (C-2''', C-6'''), 128.7 (C-3''', C-5'''), 127.4 (C-2'', C-6''), 122.9 (C-7a'), 103.7 (C-7'), 103.5 (C-5'), 60.1 (C-2), 56.0 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 49.9 (C-5), 29.7 (C-3), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +32$ (*c* = 0.99, CHCl₃).

MS (ESI): m/z (%) = 516.2 (100) $[M + H]^+$.

Reinheit: 93% (H₂O/ACN 65:35).

(R)-1-(4-Benzoylbenzoyl)-N-(5,6-dihydroxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamid (143)



Nach der allgemeinen Vorschrift zu Entfernung von Methylschutzgruppen (Abschnitt 9.2.4) wurden (R)-1-(4-Benzoylbenzoyl)-N-(5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carbonsäureamid (**151**, 150 mg, 0.29 mmol, 1.00 Äq.) und BBr₃ (1 M in DCM, 2.32 mL, 2.32 mmol, 8.00 Äq.) verwendet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 49:1/29:1/19:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 138 mg (0.28 mmol, 97%) als oranger Feststoff.

C₂₆H₂₁N₃O₅S (487.53 g/mol).

Schmelzbereich: 299–301 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.19 (SiO₂, DCM/MeOH + TFA 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3072, 2983, 2631, 2410, 1720, 1659, 1597, 1569, 1491, 1446, 1274, 1144, 1042, 931, 862, 694.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7.80–7.83 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7.74–7.78 (m, 4H, H-2'', H-6'', H-2''', H-6'''), 7.67–7.70 (m, 1H, H-4'''), 7.54–7.60 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 7.22 (s, 1H, H-7'), 7.11 (s, 1H, H-4'), 4.70–4.75 (m, 1H, H-2), 4.05 (s, 2H, OH), 3.50–3.71 (m, 2H, H-5), 2.27–2.37 (m, 1H, H-3^A), 1.90–1.99 (m, 3H, H-3^B, H-4).

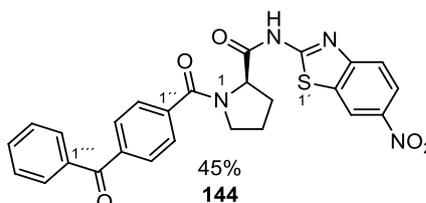
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 195.5 (CO), 170.7 (CONH), 167.7 (CONC), 155.5 (C-2'), 145.6 (C-5'), 143.9 (C-6'), 141.9 (C-3a'), 139.8 (C-4'), 138.2 (C-1'), 136.7 (C-1'''), 133.1 (C-4'''), 129.8 (C-3'', C-5''), 129.6 (C-2''', C-6'''), 128.8 (C-3''', C-5'''), 127.5 (C-2'', C-6''), 122.0 (C-7a'), 106.6 (C-7'), 106.4 (C-5'), 60.2 (C-2), 50.0 (C-5), 29.7 (C-3), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +9$ ($c = 1.05$, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 488.2 (100) $[M + H]^+$.

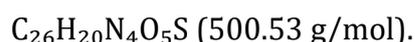
Reinheit: 96% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-1-(4-Benzoylbenzoyl)-N-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carboxamid (144)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von DMF (10 mL), 4-Benzoylbenzoesäure (**148**, 77.0 mg, 0.34 mmol, 1.10 Äq.), TBTU (103 mg, 0.32 mmol, 1.00 Äq.), DIPEA (0.11 mL, 0.68 mmol, 2.20 Äq.), (*R*)-*N*-(6-Nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carbonsäureamidhydrochlorid (**92**, 100 mg, 0.31 mmol, 1.00 Äq.). Der durch Zugabe von H₂O ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 49:1).

Ausbeute: 70.0 mg (0.14 mmol, 45%) als gelber Feststoff.



Schmelzbereich: 142–145 °C (DCM/MeOH).

DC: $R_f = 0.38$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3199, 3072, 3048, 2978, 2868, 1704, 1663, 1601, 1573, 1532, 1446, 1332, 1267, 1164, 711.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.06 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, H-7'), 8.27 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-5'), 7.92 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4'), 7.84–7.76 (m, 6H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6'', H-2''', H-6'''), 7.56–7.61 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 4.77–4.80 (m, 1H, H-2), 3.58–3.72 (m, 2H, H-5), 2.36–2.44 (m, 1H, H-3^A), 1.92–2.08 (m, 3H, H-3^B, H-4).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 195.3 (CO), 172.0 (CONH), 167.7 (CONC), 163.5 (C-2'), 153.4 (C-3a'), 143.1 (C-6'), 140.8 (C-4'), 138.3 (C-1'),

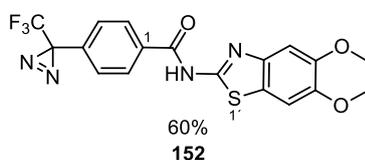
136.7 (C-1'''), 133.0 (C-4'''), 132.3 (C-7a'), 129.7 (C-2''', C-6'''), 129.6 (C-3'', C-5''), 128.7 (C-3''', C-5'''), 127.4 (C-2'', C-6''), 121.8 (C-5'), 120.6 (C-4'), 119.1 (C-7'), 60.3 (C-2), 49.8 (C-5), 29.5 (C-3), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +93$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

MS (ESI): m/z (%) = 501.2 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 523.3 (16) $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Reinheit: 99% ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 55:45).

N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzamid (152)



Nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) wurde 4-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoesäure (**149**, 40.1 mg, 0.22 mmol, 1.10 Äq.) in DMF (5 mL) gelöst, danach wurden TBTU (70.6 mg, 0.22 mmol, 1.10 Äq.) und DIPEA (0.14 mL, 0.82 mmol, 4.10 Äq.) hinzugegeben. Nach 1.5 Stunden erfolgte die Zugabe von 2-Amino-5,6-dimethoxybenzo[d]thiazol (**60**, 40.1 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.). Die Reaktion wurde mit H_2O terminiert und mit DCM extrahiert. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (SiO_2 , DCM/MeOH 19:1).

Ausbeute: 52.0 mg (0.12 mmol, 60%) als gelber Feststoff.

$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ (422.38 g/mol).

Schmelzbereich: 218–220 °C (DCM/MeOH).

DC: $R_f = 0.27$ (SiO_2 , DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2974, 2938, 2931, 1663, 1605, 1548, 1487, 1438, 1283, 1221, 1156, 931, 833.

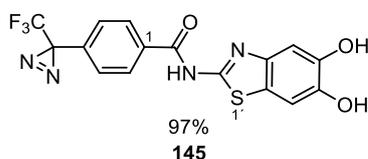
$^1\text{H-NMR}$, COSY (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) = 12.83 (s, 1H, NH), 8.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.58 (s, 1H, H-7'), 7.44 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.30 (s, 1H, H-4'), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (s, 3H, OCH_3).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.2 (CONH), 156.6 (C-2'), 149.1 (C-5'), 147.3 (C-6'), 141.9 (C-3a'), 133.9 (C-1), 131.6 (C-4), 129.2 (C-2, C-6), 126.6 (C-3, C-5), 123.6 (C-7a'), 123.0 (CF₃), 103.8 (C-7'), 103.2 (C-4'), 56.0 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 27.9 (CNN).

MS (ESI): m/z (%) = 423.1 (100) [M + H]⁺, 445.0 (30) [M + Na]⁺.

Reinheit: 98% (H₂O/ACN 45:55).

***N*-(5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzamid (145)**



N-(5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzamid (**152**, 30.0 mg, 0.07 mmol, 1.00 Äq.) und BBr₃ (1 M in DCM, 0.43 mL, 0.43 mmol, 6.00 Äq.) wurden wie in Abschnitt 9.2.4 beschrieben, eingesetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (SiO₂, DCM/MeOH 49:1/29:1/19:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 27.0 mg (0.06 mmol, 97%) als grün-gelber Feststoff.

C₁₆H₉F₃N₄O₃S (394.33 g/mol).

Schmelzbereich: 238–240 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.33 (SiO₂, DCM/MeOH + TFA 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3354, 3183, 2635, 1684, 1614, 1577, 1491, 1454, 1344, 1291, 1193, 1144, 1029, 943, 849, 735.

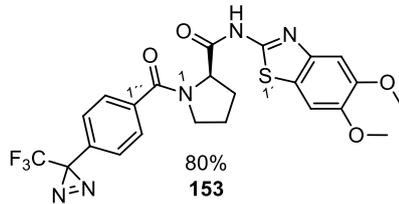
¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2, H-6), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3, H-5), 7.26 (s, 1H, H-7'), 7.13 (s, 1H, H-4'), 4.20 (s, 2H, OH).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 164.8 (CONH), 158.2 (C-2'), 145.8 (C-5'), 144.2 (C-6'), 141.8 (C-3a'), 134.1 (C-1), 131.5 (C-4), 129.2 (C-2, C-6), 126.6 (C-3, C-5), 123.6 (CF₃), 121.7 (C-7a'), 106.5 (C-7'), 105.9 (C-4'), 27.9 (CNN).

MS (ESI): m/z (%) = 395.1 (100) [M + H]⁺, 417.1 (29) [M + Na]⁺.

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (153)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von DMF (5 mL), 4-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoesäure (**149**, 30 mg, 0.13 mmol, 1.10 Äq.), TBTU (41.7 mg, 0.13 mmol, 1.10 Äq.), HOBT (17.6 mg, 0.13 mmol, 1.10 Äq.), DIPEA (80.0 μ L, 0.47 mmol, 3.90 Äq.), (R)-N-(5,6-Dimethoxybenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carbonsäureamidhydrochlorid (**89**, 41.3 mg, 0.12 mmol, 1.00 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM extrahiert und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt bedurfte keiner weiteren Reinigung.

Ausbeute: 50.0 mg (0.10 mmol, 80%) als beiger Feststoff.

$C_{23}H_{20}F_3N_5O_4S$ (519.5 g/mol).

Schmelzbereich: 211–212 °C (DCM).

DC: $R_f = 0.24$ (SiO₂, DCM/MeOH + TFA19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3162, 3072, 2991, 2958, 2901, 1699, 1601, 1561, 1487, 1434, 1332, 1283, 1217, 1168, 1062, 931, 841.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.42 (s, 1H, NH), 7.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.55 (s, 1H, H-7'), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.30 (s, 1H, H-4'), 4.71–4.75 (m, 1H, H-2), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.47–3.64 (m, 2H, H-5), 2.30–2.36 (m, 1H, H-3^A), 1.89–2.00 (m, 3H, H-3^B, H-4).

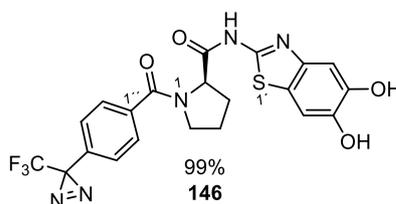
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.7 (CONH), 167.2 (CONC), 156.6 (C-2'), 148.9 (C-5'), 147.0 (C-6'), 142.5 (C-3a'), 137.8 (C-1'), 129.3 (C-2'', C-6''), 128.2 (C-4''), 126.4 (C-3'', C-5''), 123.6 (CF₃), 122.9 (C-7a'), 103.7 (C-7'), 103.5 (C-4'), 60.1 (C-1), 56.0 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 49.8 (C-5), 29.6 (C-3), 27.9 (CNN), 25.1 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +16$ ($c = 0.36$, CHCl₃).

MS (ESI): m/z (%) = 520.3 (100) [M + H]⁺.

Reinheit: >99% (H₂O/ACN 45:55).

(R)-N-(5,6-Dihydroxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-1-(4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (146)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift zur Entfernung der Methylschutzgruppe (Abschnitt 9.2.4) unter Verwendung von *N*-(5,6-Dimethoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-1-(4-(3-(trifluoromethyl)3*H*-diazirin-3-yl)benzoyl)pyrrolidin-2-carbonsäureamid (**153**, 55.0 mg, 0.11 mmol, 1.00 Äq.) und BBr₃ (1 M in DCM, 0.88 mL, 0.88 mmol, 8.00 Äq.). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, DCM/MeOH 49:1 + 0.1% TFA).

Ausbeute: 51.5 mg (0.10 mmol, 99%) als grauer Feststoff.

C₂₁H₁₆F₃N₅O₄S (491.44 g/mol).

Schmelzbereich: 219–219.5 °C (DCM/MeOH).

DC: R_f = 0.28 (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3395, 3199, 1683, 1605, 1569, 1491, 1430, 1340, 1299, 1185, 1140, 931, 821, 711.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 12.24 (s, 1H, NH), 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.21 (s, 1H, H-7'), 7.10 (s, 1H, H-4'), 4.66–4.70 (m, 1H, H-2), 3.90 (s, 2H, OH), 3.43–3.66 (m, 2H, H-5), 2.27–2.34 (m, 1H, H-3^A), 1.87–1.94 (m, 3H, H-3^B, H-4).

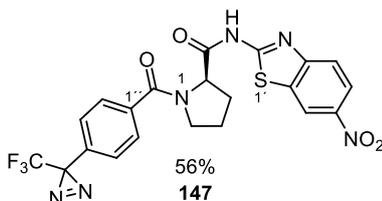
¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 170.6 (CONH), 167.3 (CONC), 155.5 (C-2'), 145.6 (C-5'), 143.9 (C-6'), 141.7 (C-3a'), 137.8 (C-1''), 129.3 (C-2'', C-6''), 128.3 (C-4''), 126.5 (C-3'', C-5''), 123.9 (CF₃), 121.9 (C-7a'), 106.5 (C-7'), 106.4 (C-4'), 60.2 (C-1), 49.9 (C-5), 29.6 (C-3), 27.8 (CNN), 25.1 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +3$ ($c = 0.83$, MeOH).

MS (ESI): m/z (%) = 492.2 (100) $[M + H]^+$.

Reinheit: 99% (H₂O/ACN 55:45).

(R)-N-(6-Nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)-1-(4-(3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxamid (147)



Hergestellt nach der allgemeinen Vorschrift für TBTU-Kupplungen (Abschnitt 9.2.1) unter Verwendung von DMF (10 mL), 4-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoesäure (**149**, 20.0 mg, 0,09 mmol, 1.10 Äq.), TBTU (28.9 mg, 0.09 mmol, 1.10 Äq.), HOBt (12.2 mg, 0.09 mmol, 1.10 Äq.), DIPEA (30.0 μ L, 0.16 mmol, 2.00 Äq.), (R)-N-(6-nitrobenzo[d]thiazol-2-yl)pyrrolidin-2-carbonsäureamidhydrochlorid (**92**, 23.4 mg, 0.08 mmol, 1.00 Äq.). Der durch Zugabe von H₂O ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und die Mutterlauge nochmals mit EA extrahiert.

Ausbeute: 22.0 mg (0.04 mmol, 56%) als gelber Feststoff.

C₂₁H₁₅F₃N₅O₄S (504.44 g/mol).

Schmelzbereich: 219–220 °C (DMF/DCM).

DC: $R_f = 0.44$ (SiO₂, DCM/MeOH 19:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2970, 2954, 2876, 1708, 1601, 1520, 1442, 1340, 1262, 1144, 940.

¹H-NMR, COSY (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 13.03 (s, 1H, NH), 9.05 (s, 1H, H-7'), 8.28 (s, 1H, H-5'), 7.90 (s, 1H, H-4'), 7.73 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.38 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 4.73–4.77 (m, 1H, H-2), 3.49–3.66 (m, 2H, H-5), 2.33–2.39 (m, 1H, H-3^A), 1.88–2.02 (m, 3H, H-3^B, H-4).

¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 172.1 (CONH), 167.4 (CONC), 163.5 (C-2'), 153.5 (C-3a'), 143.1 (C-6'), 137.6 (C-1''), 132.3 (C-7a'), 129.4

(C-4'''), 128.3 (C-2''', C-6'''), 126.5 (C-3''', C-5'''), 123.7 (CF₃), 121.9 (C-4'), 120.7 (C-5'), 119.1 (C-7'), 60.4 (C-2), 49.9 (C-5), 29.5 (C-3), 27.8 (CNN), 25.2 (C-4).

Drehwert: $\alpha_{589}^{25} = +75$ ($c = 0.66$, CHCl₃).

MS (ESI): m/z (%) = 504.8 (100) [M + H]⁺, 528.2 (12) [M + Na]⁺.

Reinheit: 98% (H₂O/ACN 45:55).

10 Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organization, *Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012-2020*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, **2012**.
- [2] "Weekly epidemiological record," zu finden unter <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274315/WER9336.pdf?ua=1>, aufgerufen am 02.05.2020 um 16.58 Uhr, **2018**.
- [3] S. Bhatt, P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, M. F. Myers, D. B. George, T. Jaenisch, G. R. W. Wint, C. P. Simmons, T. W. Scott, J. J. Farrar, S. I. Hay, *Nature* **2013**, *496*, 504–507.
- [4] D. J. Gubler, *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 480–496.
- [5] M. G. Guzman, D. J. Gubler, A. Izquierdo, E. Martinez, S. B. Halstead, *Nat. Rev. Dis. Primer* **2016**, *2*, 1–25.
- [6] J. P. Messina, O. J. Brady, N. Golding, M. U. G. Kraemer, G. R. W. Wint, S. E. Ray, D. M. Pigott, F. M. Shearer, K. Johnson, L. Earl, L. B. Marczak, S. Shirude, N. Davis Weaver, M. Gilbert, R. Velayudhan, P. Jones, T. Jaenisch, T. W. Scott, R. C. Reiner, S. I. Hay, *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1508–1515.
- [7] G. L. Ruche, Y. Souarès, A. Armengaud, F. Peloux-Petiot, P. Delaunay, P. Desprès, A. Lenglet, F. Jourdain, I. Leparç-Goffart, F. Charlet, L. Ollier, K. Mantey, T. Mollet, J. P. Fournier, R. Torrents, K. Leitmeyer, P. Hilairret, H. Zeller, W. V. Bortel, D. Dejour-Salamanca, M. Grandadam, M. Gastellu-Etchegorry, *Eurosurveillance* **2010**, *15*, 19676.
- [8] R. Koch-Institut, *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018* **2018**, 247.
- [9] N. Becker, M. Geier, C. Balczun, U. Bradersen, K. Huber, E. Kiel, A. Krüger, R. Lühken, C. Orendt, A. Plenge-Bönig, A. Rose, G. A. Schaub, E. Tannich, *Parasitol. Res.* **2013**, *112*, 1787–1790.
- [10] B. Pluskota, A. Jöst, X. Augsten, L. Stelzner, I. Ferstl, N. Becker, *Parasitol. Res.* **2016**, *115*, 3245–3247.
- [11] F. Baldacchino, B. Caputo, F. Chandre, A. Drago, A. della Torre, F. Montarsi, A. Rizzoli, *Pest Manag. Sci.* **2015**, *71*, 1471–1485.
- [12] R. Rodriguez-Roche, E. A. Gould, *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–20.
- [13] G. Roopashri, M. R. Vaishali, M. P. David, M. Baig, A. Navneetham, K. Venkataraghavan, *J. Int. Oral Health JIOH* **2015**, *7*, 69–73.
- [14] J. G. Rigau-Pérez, G. G. Clark, D. J. Gubler, P. Reiter, E. J. Sanders, A. Vance Vorndam, *The Lancet* **1998**, *352*, 971–977.
- [15] N. G. Reich, S. Shrestha, A. A. King, P. Rohani, J. Lessler, S. Kalayanarooj, I.-K. Yoon, R. V. Gibbons, D. S. Burke, D. A. T. Cummings, *J. R. Soc. Interface* **2013**, *10*.
- [16] M. Montoya, L. Gresh, J. C. Mercado, K. L. Williams, M. J. Vargas, G. Gutierrez, G. Kuan, A. Gordon, A. Balmaseda, E. Harris, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*.
- [17] S.-Q. Deng, X. Yang, Y. Wei, J.-T. Chen, X.-J. Wang, H.-J. Peng, *Vaccines* **2020**, *8*.
- [18] S. B. Halstead, *Vaccine* **2017**, *35*, 6355–6358.
- [19] M. G. Guzman, E. Harris, *The Lancet* **2015**, *385*, 453–465.
- [20] M. S. Mustafa, V. Rasotgi, S. Jain, V. Gupta, *Med. J. Armed Forces India* **2015**, *71*, 67–70.
- [21] J. M. Smit, B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert, J. Wilschut, *Viruses* **2011**, *3*, 160–171.
- [22] A. Sampath, R. Padmanabhan, *Antiviral Res.* **2009**, *81*, 6–15.
- [23] C. Klein, *Pharm. Unserer Zeit* **2010**, *39*, 50–53.
- [24] J. R. Stephenson, *Vaccine* **1988**, *6*, 471–480.
- [25] S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 13–22.
- [26] S. Apte-Sengupta, D. Sirohi, R. J. Kuhn, *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *0*, 134–142.
- [27] M.-D. Fernandez-Garcia, M. Mazzon, M. Jacobs, A. Amara, *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 318–328.
- [28] C. L. Murray, C. T. Jones, C. M. Rice, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 699–708.

- [29] A. G. McDonald, S. Boyce, K. F. Tipton, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D593–D597.
- [30] “EC 3. Hydrolases,” zu finden unter <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/>, aufgerufen am 14.05.2020 um 14.25 Uhr, **2020**.
- [31] N. D. Rawlings, D. P. Tolle, A. J. Barrett, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D160–D164.
- [32] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, *Biochem. J.* **1993**, *290*, 205–218.
- [33] “MEROPS - the Peptidase Database,” zu finden unter <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/pepsum?mid=S07.001>, aufgerufen am 14.05.2020 um 14.53 Uhr, **2020**.
- [34] R. Perera, R. J. Kuhn, *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 369–377.
- [35] C. Nitsche, S. Holloway, T. Schirmeister, C. D. Klein, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11348–11381.
- [36] C. G. Noble, C. C. Seh, A. T. Chao, P. Y. Shi, *J. Virol.* **2012**, *86*, 438–446.
- [37] M. Yildiz, S. Ghosh, J. A. Bell, W. Sherman, J. A. Hardy, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2744–2752.
- [38] R. Wieczorek, K. Adamala, T. Gasperi, F. Polticelli, P. Stano, *Life* **2017**, *7*.
- [39] L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501–4524.
- [40] J. Li, S. P. Lim, D. Beer, V. Patel, D. Wen, C. Tumanut, D. C. Tully, J. A. Williams, J. Jiricek, J. P. Priestle, J. L. Harris, S. G. Vasudevan, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28766–28774.
- [41] A. K. Bera, R. J. Kuhn, J. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12883–12892.
- [42] T. S. Kiat, R. Pippen, R. Yusof, H. Ibrahim, N. Khalid, N. A. Rahman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3337–3340.
- [43] R. Othman, T. S. Kiat, N. Khalid, R. Yusof, E. Irene Newhouse, J. S. Newhouse, M. Alam, N. A. Rahman, *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1582–1591.
- [44] P. Erbel, N. Schiering, A. D’Arcy, M. Renatus, M. Kroemer, S. P. Lim, Z. Yin, T. H. Keller, S. G. Vasudevan, U. Hommel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 372–373.
- [45] B. Millies, F. von Hammerstein, A. Gellert, S. Hammerschmidt, F. Barthels, U. Göppel, M. Immerheiser, F. Elgner, N. Jung, M. Basic, C. Kersten, W. Kiefer, J. Bodem, E. Hildt, M. Windbergs, U. A. Hellmich, T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 11359–11382.
- [46] C. Nitsche, *Biophys. Rev.* **2019**, *11*, 157–165.
- [47] A. C. Gibbs, R. Steele, G. Liu, B. A. Tounge, G. T. Montelione, *Biochemistry* **2018**, *57*, 1591–1602.
- [48] Y. M. Kim, S. Gayen, C. Kang, J. Joy, Q. Huang, A. S. Chen, J. L. K. Wee, M. J. Y. Ang, H. A. Lim, A. W. Hung, R. Li, C. G. Noble, L. T. Lee, A. Yip, Q.-Y. Wang, C. S. B. Chia, J. Hill, P.-Y. Shi, T. H. Keller, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 12891–12900.
- [49] L. de la Cruz, T. H. D. Nguyen, K. Ozawa, J. Shin, B. Graham, T. Huber, G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19205–19215.
- [50] M. Brecher, Z. Li, B. Liu, J. Zhang, C. A. Koetzner, A. Alifrag, S. A. Jones, Q. Lin, L. D. Kramer, H. Li, *PLoS Pathog.* **2017**, *13*.
- [51] Y. Yao, T. Huo, Y.-L. Lin, S. Nie, F. Wu, Y. Hua, J. Wu, A. R. Kneubehl, M. B. Vogt, R. Rico-Hesse, Y. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 6832–6836.
- [52] G. Rhys, “Questionable Ligand Density: 6MO0, 6MO1, 6MO2,” zu finden unter <https://www.mail-archive.com/ccp4bb@jiscmail.ac.uk/msg47072.html>, aufgerufen am 27.04.2020 um 10.09 Uhr, **2020**.
- [53] T. J. Green, “Questionable Ligand Density: 6MO0, 6MO1, 6MO2,” zu finden unter <https://www.mail-archive.com/ccp4bb@jiscmail.ac.uk/msg47086.html>, aufgerufen am 27.04.2020 um 10.09 Uhr, **2020**.
- [54] C. Nitsche, *Dengue Zika Control Antivir. Treat. Strateg.* **2018**, *1062*, 175–186.
- [55] V. Boldescu, M. A. M. Behnam, N. Vasilakis, C. D. Klein, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 565–586.
- [56] L. F. Weigel, C. Nitsche, D. Graf, R. Bartenschlager, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7719–7733.
- [57] A. Bastos Lima, M. A. M. Behnam, Y. El Sherif, C. Nitsche, S. M. Vecchi, C. D. Klein, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5748–5755.
- [58] C. Nitsche, L. Zhang, L. F. Weigel, J. Schilz, D. Graf, R. Bartenschlager, R. Hilgenfeld, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 511–516.
- [59] Y. Gao, T. Cui, Y. Lam, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1331–1336.

- [60] C. Bodenreider, D. Beer, T. H. Keller, S. Sonntag, D. Wen, L. Yap, Y. H. Yau, S. G. Shochat, D. Huang, T. Zhou, A. Cafilisch, X.-C. Su, K. Ozawa, G. Otting, S. G. Vasudevan, J. Lescar, S. P. Lim, *Anal. Biochem.* **2009**, *395*, 195–204.
- [61] S. P. Lim, Q.-Y. Wang, C. G. Noble, Y.-L. Chen, H. Dong, B. Zou, F. Yokokawa, S. Nilar, P. Smith, D. Beer, J. Lescar, P.-Y. Shi, *Antiviral Res.* **2013**, *100*, 500–519.
- [62] P. Hauske, C. Ottmann, M. Meltzer, M. Ehrmann, M. Kaiser, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2920–2928.
- [63] A. K. Timiri, B. N. Sinha, V. Jayaprakash, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 125–143.
- [64] R. Raut, H. Beesetti, P. Tyagi, I. Khanna, S. K. Jain, V. U. Jeankumar, P. Yogeewari, D. Sriram, S. Swaminathan, *Virolog. J.* **2015**, *12*, 16.
- [65] H. Beesetti, P. Tyagi, B. Medapi, V. S. Krishna, D. Sriram, N. Khanna, S. Swaminathan, *Antivir. Ther.* **2018**, *23*, 385–394.
- [66] H. Wu, S. Bock, M. Snitko, T. Berger, T. Weidner, S. Holloway, M. Kanitz, W. E. Diederich, H. Steuber, C. Walter, D. Hofmann, B. Weißbrich, R. Spannaus, E. G. Acosta, R. Bartenschlager, B. Engels, T. Schirmeister, J. Bodem, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1100–1109.
- [67] J. W. Borst, A. J. W. G. Visser, *Meas. Sci. Technol.* **2010**, *21*, 102002.
- [68] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, **2006**.
- [69] "Lumineszenz Hauptseite," zu finden unter <http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/lumineszenz.htm>, aufgerufen am 28.05.2020 um 20.05 Uhr, **2020**.
- [70] M. Hof, R. Hutterer, V. Fidler, Eds., *Fluorescence Spectroscopy in Biology: Advanced Methods and Their Applications to Membranes, Proteins, DNA, and Cells*, Springer, Berlin ; New York, **2005**.
- [71] B. Valeur, *Mol. Fluoresc.* **2001**, 399.
- [72] W. E. Moerner, D. P. Fromm, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 3597–3619.
- [73] P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2698–2728.
- [74] A. N. Kapanidis, S. Weiss, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 10953–10964.
- [75] M. Böhmer, F. Pampaloni, M. Wahl, H.-J. Rahn, R. Erdmann, J. Enderlein, *Rev. Sci. Instrum.* **2001**, *72*, 4145–4152.
- [76] G. Krainer, S. Keller, M. Schlierf, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, *58*, 124–137.
- [77] B. Bajar, E. Wang, S. Zhang, M. Lin, J. Chu, *Sensors* **2016**, *16*, 1488.
- [78] Th. Forster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166–175.
- [79] Skruzny, Pohl, Abella, *Biosensors* **2019**, *9*, 122.
- [80] G. Gouridis, G. K. Schuurman-Wolters, E. Ploetz, F. Husada, R. Vietrov, M. de Boer, T. Cordes, B. Poolman, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 57–64.
- [81] E. Biemans-Oldehinkel, M. K. Doeven, B. Poolman, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1023–1035.
- [82] H. Mazal, G. Haran, *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2019**, *12*, 8–17.
- [83] D. Magde, E. Elson, W. W. Webb, *Phys. Rev. Lett.* **1972**, *29*, 705–708.
- [84] O. Krichevsky, G. Bonnet, *Rep. Prog. Phys.* **2002**, *65*, 251–297.
- [85] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22*.
- [86] E. L. Elson, D. Magde, *Biopolymers* **1974**, *13*, 1–27.
- [87] H. Boukari, R. Nossal, D. L. Sackett, *Biochemistry* **2003**, *42*, 1292–1300.
- [88] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3006–3008.
- [89] E. Smith, I. Collins, *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 159–183.
- [90] J. Sumranjit, S. Chung, *Molecules* **2013**, *18*, 10425–10451.
- [91] L. Dubinsky, B. P. Krom, M. M. Meijler, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 554–570.
- [92] D. Robinette, N. Neamati, K. B. Tomer, C. H. Borchers, *Expert Rev. Proteomics* **2006**, *3*, 399–408.
- [93] Z. Song, Q. Zhang, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4882–4885.
- [94] O. Jahn, K. Eckart, H. Tezval, J. Spiess, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1031–1036.
- [95] T. Mizuhara, S. Oishi, H. Ohno, K. Shimura, M. Matsuoka, N. Fujii, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2079–2087.
- [96] A. K. Schrock, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5228–5234.
- [97] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479–12520.

- [98] E. L. Vodovozova, *Biochem. Mosc.* **2007**, *72*, 1–20.
- [99] E. Leyva, D. de Loera, S. Leyva, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6759–6761.
- [100] J. Brunner, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 483–514.
- [101] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661–5673.
- [102] G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–77.
- [103] S. C. R. Lummis, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40239–40245.
- [104] T. Jack, M.-D. Ruepp, A. J. Thompson, O. Mühlemann, M. Lochner, *Chim. Int. J. Chem.* **2014**, *68*, 239–242.
- [105] T. Jack, M. Leuenberger, M.-D. Ruepp, S. K. V. Vernekar, A. J. Thompson, S. Braga-Lagache, M. Heller, M. Lochner, *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 438–450.
- [106] B. De Strooper, T. Iwatsubo, M. S. Wolfe, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a006304–a006304.
- [107] N. Pozdnyakov, H. E. Murrey, C. J. Crump, M. Pettersson, T. E. Ballard, C. W. am Ende, K. Ahn, Y.-M. Li, K. R. Bales, D. S. Johnson, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 9710–9720.
- [108] C. J. Crump, D. S. Johnson, Y.-M. Li, *Biochemistry* **2013**, *52*, 3197–3216.
- [109] C. J. Crump, B. A. Fish, S. V. Castro, D.-M. Chau, N. Gertsik, K. Ahn, C. Stiff, N. Pozdnyakov, K. R. Bales, D. S. Johnson, Y.-M. Li, *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 705–710.
- [110] A. K. Hamouda, S. S. Jayakar, D. C. Chiara, J. B. Cohen, *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *53*, 480–486.
- [111] A. Mourot, T. Grutter, M. Goeldner, F. Kotzyba-Hibert, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 570–583.
- [112] A. Schrattenholz, J. Godovac-Zimmermann, H.-J. Schafer, E. X. Albuquerque, A. Maelicke, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216*, 671–677.
- [113] A. K. Hamouda, T. Kimm, J. B. Cohen, *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 485–494.
- [114] D. C. Chiara, A. K. Hamouda, M. R. Ziebell, L. A. Mejia, G. Garcia, J. B. Cohen, *Biochemistry* **2009**, *48*, 10066–10077.
- [115] D. Luo, S. G. Vasudevan, J. Lescar, *Antiviral Res.* **2015**, *118*, 148–158.
- [116] M. A. M. Behnam, D. Graf, R. Bartenschlager, D. P. Zlotos, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9354–9370.
- [117] M. Brecher, Z. Li, B. Liu, J. Zhang, C. A. Koetzner, A. Alifarag, S. A. Jones, Q. Lin, L. D. Kramer, H. Li, *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006411.
- [118] X. Chen, K. Yang, C. Wu, C. Chen, C. Hu, O. Buzovetsky, Z. Wang, X. Ji, Y. Xiong, H. Yang, *Cell Res.* **2016**, *26*, 1260–1263.
- [119] K. Okamoto, Y. Sako, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *46*, 16–23.
- [120] Y. Li, G. J. Augustine, K. Weninger, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 2178–2187.
- [121] ATTO-TEC, *ATTO-TEC Fluorescent Labels and Dyes Catalogue 2019/2020*, **2019**.
- [122] “Cy3 and Cy5 Maleimide Mono-Reactive Dye Packs - GE Healthcare Life Sciences,” zu finden unter <https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/protein-analysis/blotting-and-detection/blotting-standards-and-reagents/cy3-and-cy5-maleimide-mono-reactive-dye-5-packs-p-06157#related-documents>, aufgerufen am 12.03.2020 um 16.51 Uhr, **2020**.
- [123] M. A. M. Behnam, C. Nitsche, S. M. Vecchi, C. D. Klein, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1037–1042.
- [124] D. Schönenbach, *Fluoreszenzspektroskopie an einer Dengue-Virus-Protease in Gegenwart Neuartiger Inhibitoren*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2015**.
- [125] B. Rochnyak, *Spektroskopische Ensemble- und Einzelmoleküluntersuchungen der Fluoreszenzmarkierten Dengue-Virus-Protease und des Inhibitors HWu180*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2016**.
- [126] C. Czeslik, *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 238–245.
- [127] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162*, 87–106.
- [128] S. Celik, *Spektroskopische Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen an der Dengue-Virus Protease*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2018**.
- [129] J. Stietz, *Spektroskopische Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen an einer Dengue-Virus Protease*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2017**.
- [130] M. W. Crankshaw, G. A. Grant, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **1996**, *3*, 15.1.1-15.1.18.
- [131] C. D. Spicer, B. G. Davis, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–14.

- [132] L. M. Lauth, *The Flaviviral NS2B-NS3 Protease Towards the Understanding of Protein Dynamics and Autocleavage Behaviour*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2018**.
- [133] K. Chattopadhyay, S. Saffarian, E. L. Elson, C. Frieden, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14171–14176.
- [134] O. B. Torres, A. J. Duval, A. Sulima, J. F. G. Antoline, A. E. Jacobson, K. C. Rice, C. R. Alving, G. R. Matyas, *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 3885–3903.
- [135] E. S. Price, M. S. DeVore, C. K. Johnson, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 5895–5902.
- [136] B. Millies, *Entwicklung Neuer Nicht-Kompetitiver Inhibitoren Flaviviraler NS2B/NS3-Proteasen*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2019**.
- [137] C. Steuer, K. H. Heinonen, L. Kattner, C. D. Klein, *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14*, 1102–1108.
- [138] M. Richter, A. Chakrabarti, I. R. Ruttekkolb, B. Wiesner, M. Beyermann, R. Brock, J. Rademann, *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 16708–16715.
- [139] A. Gellert, *Vinylsulfonderivate Als Potentielle NS2B/NS3 Dengue-Virus-Protease-Inhibitoren Und Expression 15N-Markierter Protease*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2015**.
- [140] C. J. Markworth, B. E. Marron, N. A. Swain, *Benzamide Derivatives*, **2010**, WO 2010/035166 A1.
- [141] N. B. Mehta, A. P. Phillips, (Mrs.) Florence Fu Lui, R. E. Brooks, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1012–1015.
- [142] H. F. Voss, J. Plattner, T. R. Herrin, *Ligand Analog-Irreversible Enzyme Inhibitor Conjugates*, **1985**, US4550163A.
- [143] H. Zheng, R. McDonald, D. G. Hall, *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 5454–5460.
- [144] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [145] Y. Huang, M. A. Shaw, E. S. Mullins, T. L. Kirley, N. Ayres, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4455–4466.
- [146] S. K. Johansen, L. Sørensen, L. Martiny, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2005**, *48*, 569–576.
- [147] M. S. Malamas, J. Sredy, C. Moxham, A. Katz, W. Xu, R. McDevitt, F. O. Adebayo, D. R. Sawicki, L. Seestaller, D. Sullivan, J. R. Taylor, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1293–1310.
- [148] R. B. Gammil, T. M. Judge, J. Morris, *Antiatherosclerotic and Antithrombotic 1-Benzopyran-4-Ones and 2-Amino-1,3-Benzoxazine-4-Ones Antiatherosclerotic and Antithrombotic 1-Benzopyran-4-Ones and 2-Amino-1,3-Benzoxazine-4-Ones*, **1997**, US5703075 A1.
- [149] E. C. Jorgensen, R. A. Wiley, *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 459–462.
- [150] Z. Yu, Tan, Loon-Seng, Fossum, Eric, *Arkivoc* **2010**, *2009*, 255.
- [151] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467–4470.
- [152] K. Sonogashira, *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 46–49.
- [153] R. Chinchilla, C. Nájera, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874–922.
- [154] K. Yoshida, K. Nishii, Y. Kano, S. Wada, A. Yanagisawa, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4231–4239.
- [155] P. Siemsen, R. C. Livingston, F. Diederich, *Angew Chem Int Ed* **2000**, *26*.
- [156] M. Rhaue, *Modifikation von NS2B-NS3-Dengue-Virus Protease-Inhibitoren für Fluoreszenzmarkierungen*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2017**.
- [157] J. Yin, J. Zhang, C. Cai, G.-J. Deng, H. Gong, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 387–392.
- [158] G. Trapani, M. Franco, A. Latrofa, A. Reho, G. Liso, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 209–216.
- [159] M. G. Vivas, D. L. Silva, L. De Boni, Y. Bretonniere, C. Andraud, F. Laibe-Darbour, J.-C. Mulatier, R. Zaleśny, W. Bartkowiak, S. Canuto, C. R. Mendonca, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 14677–14688.
- [160] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999.
- [161] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [162] M. Yamada, M. Matsumura, Y. Uchida, M. Kawahata, Y. Murata, N. Kakusawa, K. Yamaguchi, S. Yasuike, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1309–1313.
- [163] M. A. Gauthier, M. I. Gibson, H.-A. Klok, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 50–60.
- [164] E. J. G. Peterman, G. J. L. Wuite, Eds., *Single Molecule Analysis: Methods and Protocols*, Humana Press, New York, **2011**.

- [165] A. D. Baldwin, K. L. Kiick, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1946–1953.
- [166] D. Kalia, P. V. Malekar, M. Parthasarathy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1432–1435.
- [167] S. H. Frayne, R. R. Murthy, B. H. Northrop, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 7946–7956.
- [168] M. Lebendiker, T. Danieli, *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 236–246.
- [169] M. Hashimoto, Y. Hatanaka, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 2513–2523.
- [170] L. Switzar, M. Giera, W. M. A. Niessen, *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 1067–1077.
- [171] K. Hansen, S. Szarka, E. Escoffier, A. Berthet, J. Venet, J. Collet-Brose, S. Hepburn, M. Wright, R. Wheller, R. Nelson, R. G. Kay, *Bioanalysis* **2018**, *10*, 997–1007.
- [172] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [173] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589–1600.
- [174] E. Lerner, G. Hilzenrat, D. Amir, E. Tauber, Y. Garini, E. Haas, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 5983–5991.
- [175] M. W. Allen, R. J. B. Urbauer, A. Zaidi, T. D. Williams, J. L. Urbauer, C. K. Johnson, *Anal. Biochem.* **2004**, *325*, 273–284.
- [176] M. de Boer, G. Gouridis, R. Vietrov, S. L. Begg, G. K. Schuurman-Wolters, F. Husada, N. Eleftheriadis, B. Poolman, C. A. McDevitt, T. Cordes, *bioRxiv* **2019**.
- [177] S. Ludewig, M. Kossner, M. Schiller, K. Baumann, T. Schirmeister, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 368–382.
- [178] G. Han, M. Tamaki, V. J. Hruby, *J. Pept. Res.* **2001**, *58*, 338–341.
- [179] J. Bartels, P. Lu, K. Maurer, A. V. Walker, K. D. Moeller, *Langmuir* **2011**, *27*, 11199–11205.
- [180] M. Frotscher, E. Ziegler, S. Marchais-Oberwinkler, P. Kruchten, A. Neugebauer, L. Fetzer, C. Scherer, U. Müller-Vieira, J. Messinger, H. Thole, R. W. Hartmann, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2158–2169.
- [181] H. Essien, J. Y. Lai, K. J. Hwang, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 898–901.
- [182] J. E. T. Corrie, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1994**, 2975.
- [183] Y. Kira, Y. Okazaki, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara, *Amino Acids* **2010**, *39*, 587–597.
- [184] T. C. Johnson, W. G. Totty, M. Wills, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5230–5233.
- [185] Y.-H. Hu, J.-C. Wang, S. Yang, Y.-A. Li, Y.-B. Dong, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 8341–8347.
- [186] M. Sato, K. Kawakami, T. Suzuki, H. Morisawa, S. Nishimura, C. Kaneko, *Steroids* **1989**, *53*, 739–750.
- [187] J. P. Buisson, R. Royer, P. Gayral, *Eur. J. Med. Chem.* **1984**, *19*, 249–53.
- [188] R. J. Bergeron, N. Bharti, J. Wiegand, J. S. McManis, H. Yao, L. Prokai, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4120–4137.
- [189] Y. Tian, J. Jin, C. Wang, W. Lv, X. Li, X. Che, Y. Gong, Y. Li, Q. Li, J. Hou, P. G. Wang, J. Shen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2434–2437.
- [190] M. Bobrich, H. Schwarz, K. Levsen, P. Schmitz, *Org. Mass Spectrom.* **1977**, *12*, 549–556.
- [191] H. T. Srinivasa, S. HariPrasad, *J. Organomet. Chem.* **2014**, *774*, 19–25.
- [192] Y. Hori, T. Norinobu, M. Sato, K. Arita, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12360–12365.
- [193] A. K. Yatawara, G. Tiruchinapally, A. N. Bordenyuk, P. R. Andreana, A. V. Benderskii, *Langmuir* **2009**, *25*, 1901–1904.
- [194] M. Ali, D. H. Hasenöhrl, L. Zeininger, A. R. M. Müllner, H. Peterlik, A. Hirsch, *Helv. Chim. Acta* **2019**, *102*, e1900015.

11 Anhang

11.1 SDS-PAGE nach Fluoreszenzmarkierung

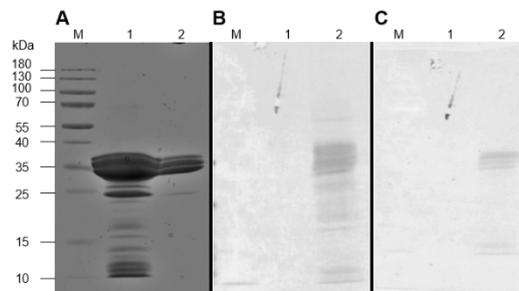


Abbildung 11.1: SDS-PAGE der nicht-markierten (Spur 1) und markierten Wildtyp-Protease 1 (ATTO 488/ATTO 647N, Spur 2). **A)** Coomassie-Färbung, **B)** Fluoreszenzscan bei 633 nm, **C)** Fluoreszenzscan bei 532 nm.

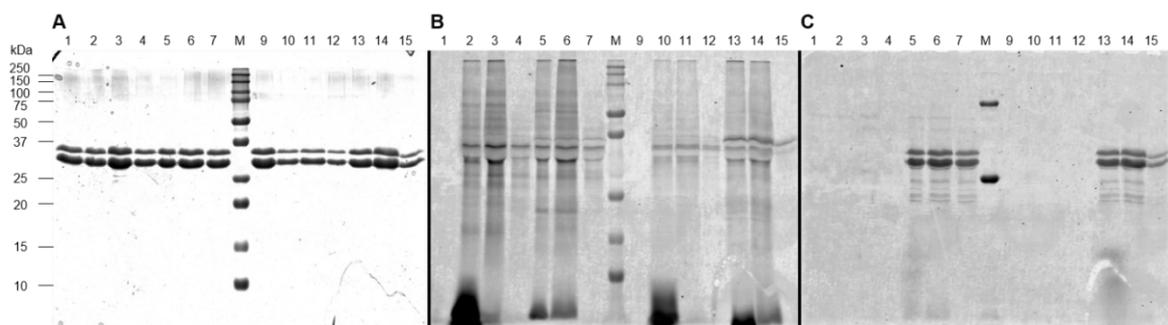


Abbildung 11.2: SDS-PAGE der markierten Wildtyp-Proteasen 2-5 (ATTO 488, ATTO 647N). **A)** Coomassie-Färbung, **B)** Fluoreszenzscan bei 633 nm, **C)** Fluoreszenzscan bei 532 nm. 1: WT-2/3 vor Markierung, 2: WT-2-Cy5 vor Dialyse, 3: WT-2-Cy5 vor GPC, 4: WT-2-Cy5 nach GPC, 5: WT-3-ATTO vor Dialyse, 6: WT-3-ATTO vor GPC, 7: WT-3-ATTO nach GPC, 9: WT-4/5 vor Markierung, 10: WT-4-Cy5 vor Dialyse, 11: WT-4-Cy5 vor GPC, 12: WT-4-Cy5 nach GPC, 13: WT-5-ATTO vor Dialyse, 14: WT-5-ATTO vor GPC, 15: WT-5-ATTO nach GPC (ATTO steht für ATTO 488 und ATTO 647N)

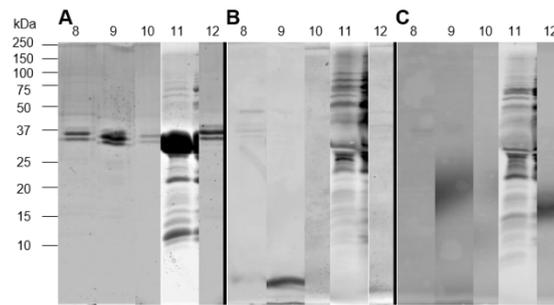


Abbildung 11.3: SDS-PAGE-Ausschnitte der markierten Wildtyp-Proteasen 8–12 (ATTO 488, ATTO 647N) nach DGC-Reinigung. **A)** Coomassie-Färbung, **B)** Fluoreszenzscan bei 633 nm, **C)** Fluoreszenzscan bei 532 nm. Nummerierung entspricht den Proteasen.

11.2 Rohdaten Photoaffinitätsmarkierung

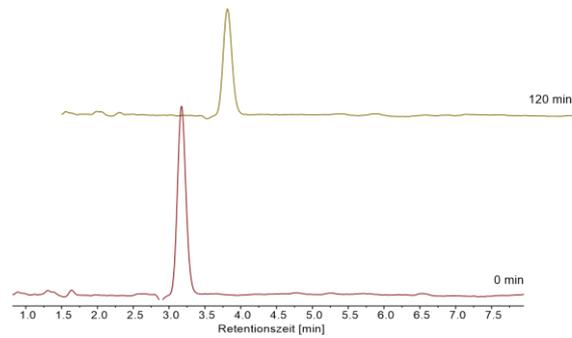


Abbildung 11.4: UV-Chromatogramme (254 nm) von **147** nach 0 und 120 Minuten bei Tageslicht. Es wird kein Zerfall der Probe durch Tageslicht beobachtet.



Abbildung 11.5: DENV2-NS2B-NS3-Protease nach Trypsin-Verdau. Daten erhalten von [REDACTED].

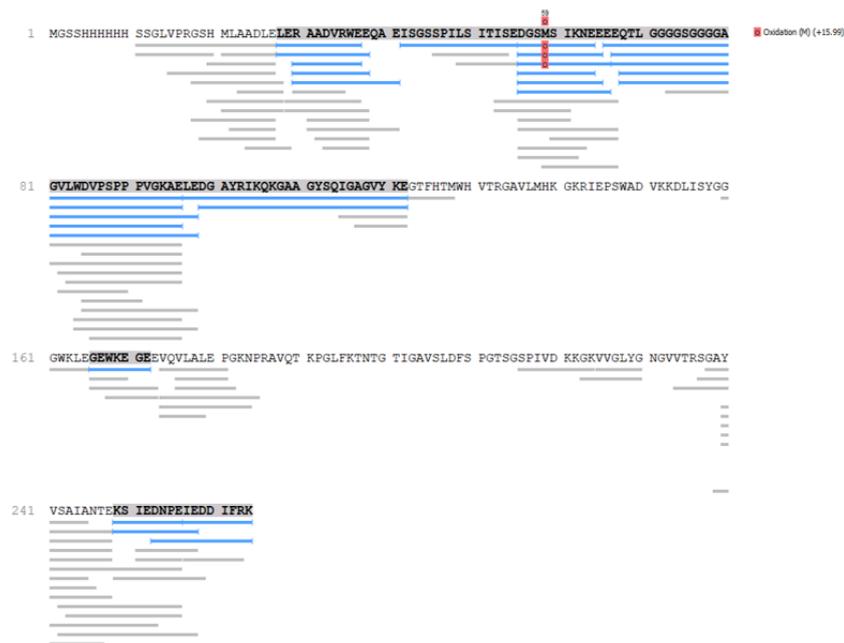


Abbildung 11.6: DENV2-NS2B-NS3-Protease nach Glu-C-Verdau. Daten erhalten von [REDACTED].



Abbildung 11.7: ZIKV-NS2B-NS3-Protease nach Trypsin-Verdau. Daten erhalten von [REDACTED].

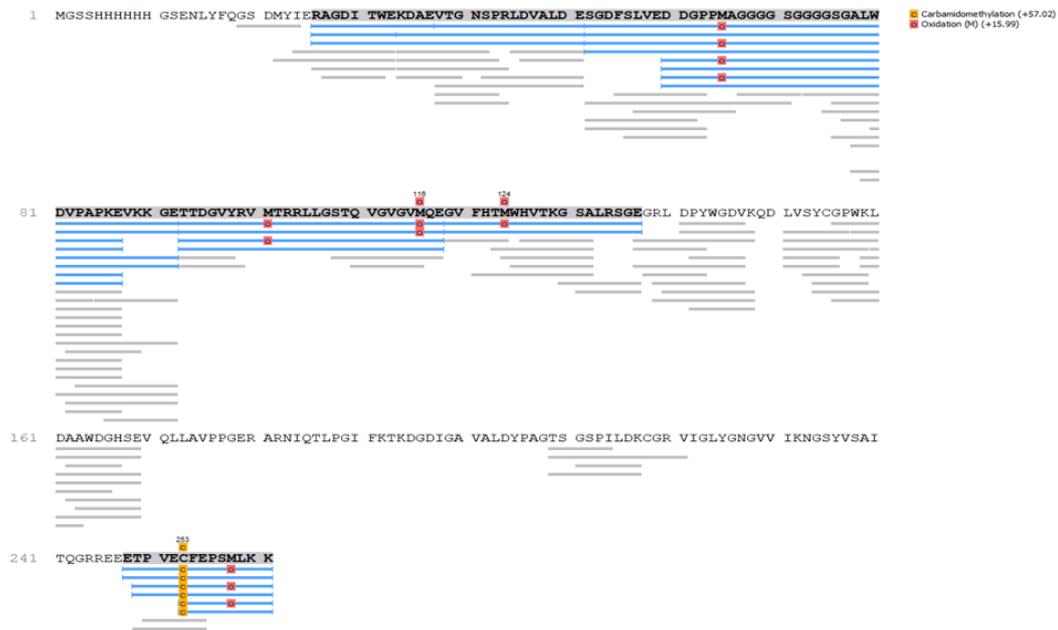


Abbildung 11.8: ZIKV-NS2B-NS3-Protease nach Glu-C-Verdau. Daten erhalten von [REDACTED]

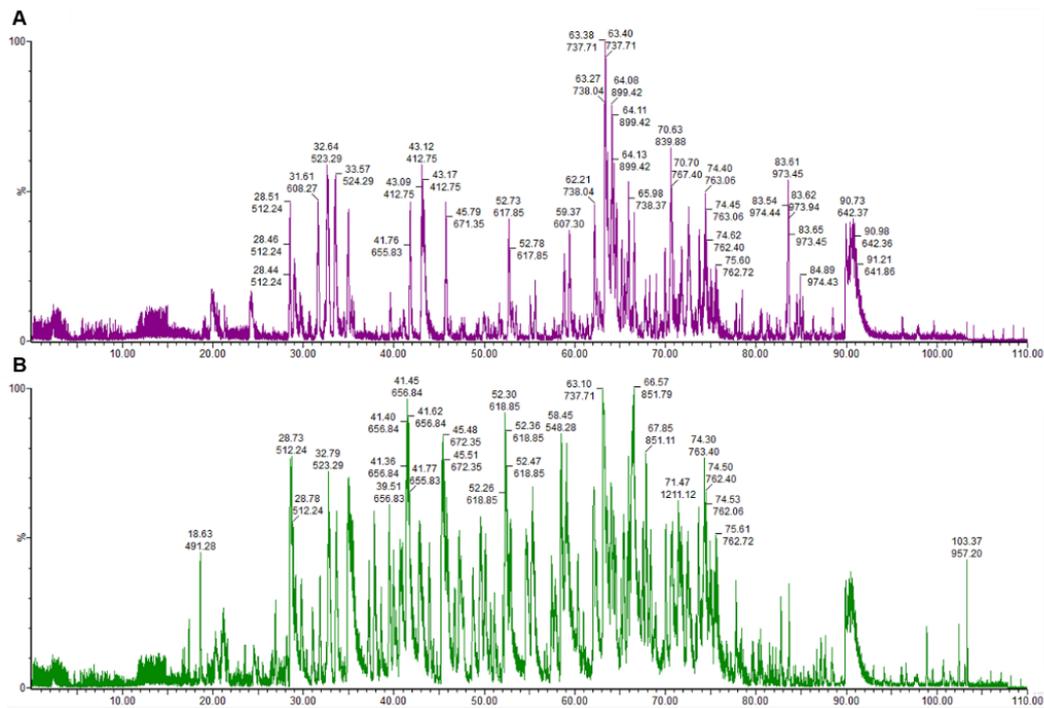


Abbildung 11.9: Massenspektrum der DENV2-NS2B-NS3-Protease. **A)** DENV (125 nM) + DMSO + 365 nm (24 Min, 2 cm, 10%), **B)** DENV (5 μM) nativ. Daten erhalten von [REDACTED]

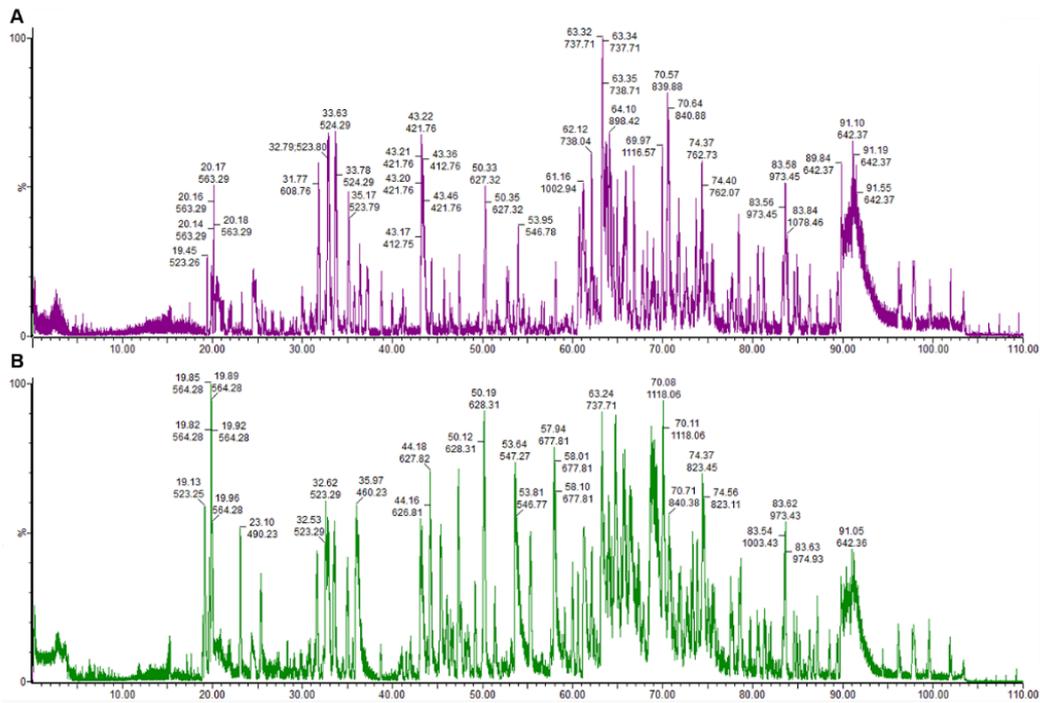


Abbildung 11.10: Massenspektrum der ZIKV2-NS2B-NS3-Protease. **A)** DENV (25 nM) + DMSO + 365 nm (24 Min., 2 cm, 10%), **B)** DENV (5 μ M) nativ. Daten erhalten von [REDACTED]