

SYNTHESE EN BIOLOGISCHE EVALUATIE VAN DIKETOPIPERAZINEN ALS ANALOGEN VAN FEROMONEN VAN *SEMINAVIS ROBUSTA*

Aantal woorden: 23908

Amber De Baets

Stamnummer: 01205485

Promotor: Prof. dr. ir. S. Mangelinckx

Copromotor: Prof. dr. W. Vyverman

Tutor: ir. E. Bonneure

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad Master of Science in de
bio-ingenieurswetenschappen: chemie en bioprocestechnologie

Academiejaar: 2016 - 2017

De auteur en de promotor geven toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.

The author and the promotor give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using results from this thesis.

Gent, juni 2017

De promotor,

De auteur,

Prof. dr. ir. S. Mangelinckx

Prof. dr. W. Vyverman

Amber De Baets

Woord Vooraf

Na vijf jaar zwoegen en zweten, afgewisseld met een goede portie ontspanning, vormt deze masterthesis het einde van een geweldige studententijd. Dit laatste jaar stond voornamelijk in het teken van mijn masterthesis, waarin ik de kans heb gekregen om mijn chemische kennis te verbreden en waarin ik mij mocht inwijden in de wereld van de diatomeeën. Ik had dit alles niet tot een goed einde kunnen brengen zonder de hulp van een aantal mensen, die ik dan ook graag wil bedanken.

Eerst en vooral wil ik mijn promotor, Prof. dr. ir. Sven Mangelinckx, bedanken, die me de kans heeft gegeven me in dit onderwerp te verdiepen. Ik wil hem ook bedanken voor zijn suggesties en tips tijdens de maandelijkse meetings, die mee hebben bijgedragen tot de realisatie van mijn masterthesis. Ook mijn copromotor, Prof. dr. Wim Vyverman, wil ik bedanken voor zijn nuttige opmerkingen bij het schrijven van mijn masterthesis.

Hiernaast wil ik mijn tutor, Eli Bonneure, bedanken om mij gedurende dit jaar geduldig met raad en daad bij te staan. Wanneer ik met een probleem zat, kon ik altijd bij hem terecht. Bovendien wil ik hem ook bedanken voor het werk dat aan elke biologische test vooraf ging en dat hij telkens op zich heeft genomen.

Verder zou ik ook graag alle andere doctoraatsstudenten bedanken, waarbij ik terecht kon met vragen en problemen. Ook bedankt aan alle thesisstudenten voor de aangename sfeer zowel in, als naast het labo. Ik ben blij dat ik jullie heb leren kennen en jullie hebben ervoor gezorgd dat dit zware jaar op een toffe manier is verlopen. Dat er nog veel memorabele avonden mogen volgen! Naast de vrienden van het labo, wil ik ook alle andere mensen die ik tijdens deze vijf jaar aan het Boerekot heb leren kennen, met in het bijzonder de Bio-bitchezzz, bedanken. Jullie hebben bijgedragen tot een geweldige tijd die ik de rest van mijn leven met me zal meedragen. Ik kijk al uit naar de komende housewarming-parties en afterworkfeestjes.

Ten slotte wil ik ook mijn familie bedanken voor hun steun en geduld, niet enkel dit jaar, maar ook de voorbije jaren. Dankjewel voor de kansen die jullie mij gegeven hebben, want zonder jullie had ik nooit dit mooie resultaat kunnen bereiken. I also want to thank Elia. Thank you for understanding that I was busy this year and that I didn't have a lot of time to spend with you. Grazie per avermi supportato. Non vedo l'ora di iniziare un nuovo capitolo della mia vita con te.

Amber De Baets, juni, 2017

Inhoudsopgave

Woord Vooraf	i
Gebruikte afkortingen	vii
1. Situering en doel	1
1.1 Situering	1
1.1.1 Morfologie en eigenschappen van diatomeeën	1
1.1.2 De voortplantingscyclus van diatomeeën.....	2
1.1.3 Industriële toepassingen van diatomeeën.....	5
1.2 Doel	6
1.2.1 Synthese van de <i>L</i> -diproline-analogen.....	6
1.2.2 Biologische testen	7
2. Literatuurstudie	9
2.1 Diketopiperazinen.....	9
2.1.1 Algemeen.....	9
2.1.2 Diketopiperazinen in de natuur.....	11
2.2 Biologische synthese van cyclodipeptiden	13
2.2.1 Cyclodipeptidesynthase (CDPS).....	13
2.2.2 Niet-ribosomaal peptidesynthetase (NRPS)	17
2.3 Biologische synthese van <i>L</i> -proline en <i>L</i> -diproline in <i>Seminavis robusta</i>	21
2.3.1 <i>L</i> -proline	21
2.3.2 <i>L</i> -diproline	22
2.4 Besluit.....	24
3. Bespreking van de resultaten	25
3.1 Synthese van de <i>L</i> -proline-analogen	25
3.1.1 Synthese van <i>N</i> -Boc-4-oxo- <i>L</i> -proline	25
3.1.2 Synthese van <i>trans</i> -4-azido- <i>L</i> -proline methylester.HCl	28
3.1.3 Synthese van <i>cis</i> -4-hydroxy- <i>L</i> -proline methylester.HCl.....	30
3.1.4 Synthese van <i>L</i> -methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaet.....	30
3.1.5 Synthese van <i>N</i> -Boc-foto- <i>L</i> -proline	32
3.2 Synthese van de <i>L</i> -diproline-analogen	34

3.2.1	Algemene procedure voor de synthese van de <i>L</i> -diproline-analogen	34
3.2.2	Koppeling van <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -azetidine-2-carbonzuur en <i>L</i> -proline methylester.HCl.....	35
3.2.3	Koppeling van <i>N</i> -Boc-4-oxo- <i>L</i> -proline en <i>L</i> -proline methylester.HCl.....	36
3.2.4	Koppeling van <i>N</i> -Boc-4-oxo- <i>L</i> -proline en <i>trans</i> -4-hydroxy- <i>L</i> -proline methylester.HCl	37
3.2.5	Koppeling van <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -proline en <i>trans</i> -4-azido- <i>L</i> -proline methylester.HCl.....	38
3.2.6	Koppeling van <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -proline en <i>cis</i> -4-hydroxy- <i>L</i> -proline methylester.HCl	38
3.2.7	Koppeling van <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -proline en <i>L</i> -methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaet	39
3.3	Biologische testen	39
3.3.1	Algemeen.....	39
3.3.2	Attractie-assay.....	43
3.3.3	Inhibitie-assay.....	44
3.3.4	Verder onderzoek.....	51
4.	Samenvatting en besluit	53
4.1	Samenvatting	53
4.2	Besluit.....	57
5.	Experimenteel deel	59
5.1	Analysemethoden	59
5.1.1	Dunnelaagchromatografie (TLC).....	59
5.1.2	Kolomchromatografie	59
5.1.3	Automatische kolomchromatografie.....	59
5.1.4	Vloeistofchromatografie-massaspectroscopie (LC-MS)	59
5.1.5	Automatische preparatieve HPLC.....	60
5.1.6	NMR-spectroscopie.....	60
5.1.7	Massaspectrometrie (MS)	60
5.1.8	Infraroodspectroscopie.....	60
5.1.9	Smeltpuntbepaling.....	60
5.1.10	Automatische balans	61
5.1.11	Lichtmicroscop.....	61
5.2	Droge solventen	61
5.3	Veiligheid.....	61

5.3.1	Algemene veiligheidsaspecten	61
5.3.2	Specifieke veiligheidsrisico's	62
5.4	Synthesemethoden en karakterisaties.....	62
5.4.1	Synthese van de <i>L</i> -proline-analogen	62
5.4.2	Synthese van de <i>L</i> -diproline-analogen.....	65
5.5	Biologische testen van de gesynthetiseerde verbindingen	68
6.	Literatuurlijst.....	71

Gebruikte afkortingen

aa-tRNA	aminoacyl-tRNA
AC	adenylaatcyclase
A-domein	adenyleringsdomein
AZ	aminozuur
	Ala alanine
	Gly glycine
	His histidine
	Phe fenylalanine
	Pro proline
	Tyr tyrosine
	Val valine
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	di(<i>tert</i> -butyl)dicarbonaat
cAMP	3',5'-cyclisch adenosinemonofosfaat
C-domein	condensatiedomein
CDP	cyclodipeptide
CDPS	cyclodipeptidesynthase
cGMP	3',5'-cyclisch guanosinemonofosfaat
cGP	cyclo(Gly-L-Pro)
CoA	Coenzyme A
cPP	cyclo(Pro-Pro)
<i>D</i> -DP	<i>D</i> -diproline
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DKP	diketopiperazine
DMF	dimethylformamide
EDC.HCl	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
GC	guanylaatcyclase
γ -GK	γ -glutamylkinase

GLM	<i>Generalized Linear Model</i>
GPE	N-terminaal tripeptide
GSA	glutaminezuur- γ -semialdehyde
GTP	guanosinetrifosfaat
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
LC-MS	vloeistofchromatografie-massaspectroscopie
L-DP	<i>L</i> -diproline
MS	massaspectrometrie
MSDS	<i>Material Safety Data Sheet</i>
MT ⁺	migrerend paringstype
MT ⁻	lokkend paringstype
NRPS	niet-ribosomaal peptidesynthetase
P5CR	Δ 1-pyrroline-5-carboxylaatreductase
P5CS	Δ 1-pyrroline-5-carboxylaatsynthetase
PAL	<i>photoaffinity labeling</i>
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulated</i>
PCP-domein	peptidyl <i>carrier</i> proteïne-domein
PDE	fosfodiesterase
4'-Ppant	4'-fosfopantetheine
SA	salicylzuur
SAR	structuur-activiteitsrelatie
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>
SIP	<i>sex inducing pheromones</i>
SST	<i>sexual size threshold</i>
TE-domein	thioesterasedomein
TFA	trifluorazijnzuur
THF	tetrahydrofuraan
TLC	dunnelaagchromatografie
TRH	<i>thyrotropin-releasing</i> hormoon

Hoofdstuk 1

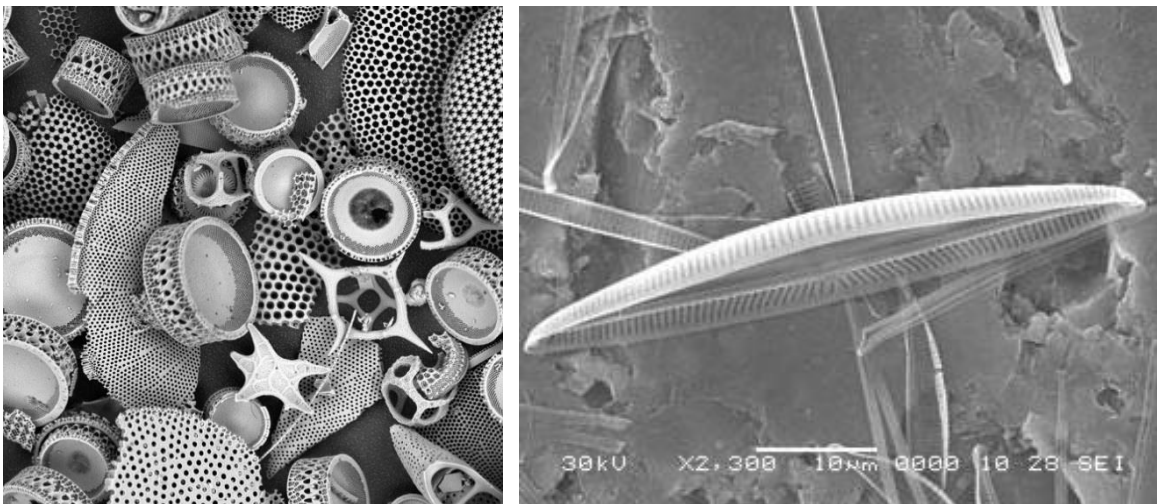
Situering en doel

1.1 Situering

In het eerste deel van deze masterthesis wordt het onderwerp kort gekaderd. Zowel de eigenschappen, de voortplanting en het belang van diatomeeën zullen besproken worden.

1.1.1 Morfologie en eigenschappen van diatomeeën

Diatomeeën (Figuur 1) zijn ééncellige eukaryote fytoplanktonorganismen die voornamelijk voorkomen in zoutwater, maar ze kunnen ook in zoetwater en aarde overleven.^{1,2} Ze werden voor het eerst beschreven in 1703 door een Engelse wetenschapper die ze observeerde met zijn microscoop op de wortels van de vijverplant *Lemna*, maar vooruitgang omtrent de kennis van diatomeeën liet op zich wachten tot het begin van de 19^e eeuw.² Hun naam is afgeleid van de Griekse woorden *dia* en *temnein*, die respectievelijk 'door' en 'snijden' betekenen, wat samen 'in de helft gesneden' wil zeggen.^{3,4} Diatomeeën behoren tot de klasse Bacillariophyceae in het fylum Bacillariophyta dat onderdeel uitmaakt van de Protista.^{5,6} Er bestaan meer dan 200 genera met meer dan 2×10^5 species.^{7,8}



Figuur 1: Links: Strooiopreparaat van diatomeeën, SEM-opname⁹; Rechts: SEM-opname van *Seminavis robusta*¹⁰

De diatomeecel kan variëren in grootte tussen 5 en 500 µm en is opgebouwd uit een celwand, een celmembraan en organellen.^{2,11} De voornaamste bouwsteen van de celwand, ook frustule genoemd, is silica (SiO₂). De frustule bestaat uit twee overlappende delen (thecae), waarvan het bovenste deel de epitheca wordt genoemd en het onderste de hypotheca. Deze passen op elkaar zoals de twee delen van een petriplaat, waarbij een gordel voorkomt dat er openingen tussen de

twee thecae ontstaan.¹² De frustule bevat poriën die ervoor zorgen dat contact met de omgeving mogelijk is. De celinhoud bestaat uit een nucleus en een vacuole die chloroplasten bevat, wat diatomeeën in staat stelt om aan fotosynthese te doen.¹

Diatomeeën spelen een belangrijke rol in de carbonaat-silicaat geochemische cyclus. Door vertering van silicaathoudende gesteenten worden siliciumzuur ($\text{Si}(\text{OH})_4$) en HCO_3^- geproduceerd. Rivieren transporteren deze opgeloste stoffen naar kustzones en meren, waar ze door diatomeeën kunnen omgezet worden. Enerzijds zijn diatomeeën in staat om koolstof in te bouwen in organische componenten en anderzijds wordt siliciumzuur gebruikt voor de productie van frustulen. Uiteindelijk zal, na afsterven van het diatomee, de koolstof en silicium terug in de omgeving terechtkomen. Aangezien bij de vertering van silicaathoudende gesteenten CO_2 verbruikt wordt, zorgt dit proces voor een netto fixatie van CO_2 .¹³ Fytoplankton draagt bij tot 40% van de koolstoffixatie op aarde waarvan de helft toe te wijzen is aan diatomeeën.¹⁴

Diatomeeën kunnen opgedeeld worden in verschillende categorieën afhankelijk van hun voorkomen of van hun frustule. Bentische diatomeeën komen voor in laagwater of in vochtige bodems terwijl pelagische diatomeeën voorkomen in open water. De frustule kan centrisch zijn, wat wil zeggen dat de thecae rond of polygonaal zijn, maar de frustule kan ook pennaat zijn en in dat geval zijn de thecae bilateraal symmetrisch.^{2,12} Centrische diatomeeën zijn meestal pelagisch, terwijl pennate diatomeeën voornamelijk bentisch zijn.^{15,16}

In deze thesis wordt *Seminavis robusta* als modeldiatomee gebruikt (Figuur 1). Dit is een pennaat, bentisch diatomee, dat in staat is om op oppervlakken te groeien en tot 80 μm lang kan worden. De levenscyclus van *S. robusta* wordt gekenmerkt door een reductie in celgrootte in een asexuele fase en herstel hiervan in een seksuele fase (*vide infra*). Bovendien is *S. robusta* heterothallisch, wat wil zeggen dat twee verschillende paringstypes nodig zijn tijdens seksuele reproductie. Zolang de paringstypes niet worden samengebracht, kan de reproductie niet starten en op deze manier kan de reproductie gecontroleerd worden.¹⁷

1.1.2 De voortplantingscyclus van diatomeeën

1.1.2.1 Algemeen

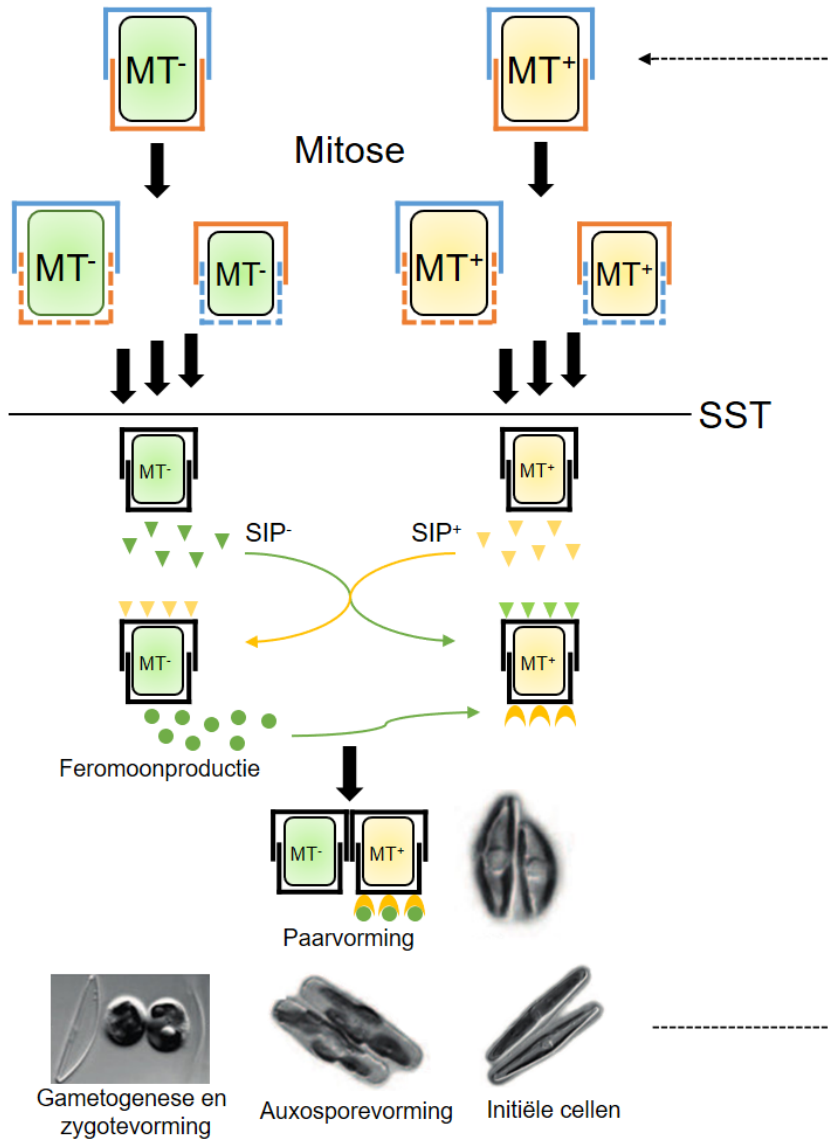
De voortplanting van diatomeeën gebeurt via asexuele mitotische deling gevolgd door korte periodes van seksuele reproductie (Figuur 2). In de vegetatieve fase zal mitose resulteren in twee dochtercellen, die de thecae van de moedercel overerven. Deze thecae vormen de epithecae van de dochtercellen, waarin hypothecae worden gesynthetiseerd. Hierdoor zorgt herhaalde deling voor een daling in de gemiddelde grootte van de populatie. Echter, wanneer de diatomeegrootte onder de *species-specific sexual size threshold* (SST) terechtkomt, wordt overgeschakeld op seksuele voortplanting om de grootte te herstellen. De overschakeling wordt ook getriggerd door factoren uit de omgeving, zoals lichtintensiteit, fotoperiode, temperatuur en zoutgehalte. Indien niet zou overgegaan worden op seksuele reproductie, zouden de cellen zich blijven delen tot klonale celdood.^{1,2,18,19}

Tijdens de seksuele fase treedt bij centrische diatomeeën oögamie op, terwijl pennate diatomeeën in de regel isogaam zijn. Bij oögamie worden vrouwelijke, onbeweeglijke oögonia en geflagelleerde mannelijke gameten gevormd. Bij pennate diatomeeën zijn de gameten morfologisch en gedragsmatig identiek. Bij de meeste pennate diatomeeën treedt paarvorming op van de gametangia (vegetatieve naar seksueel geïnduceerde cellen) waarna meiose en gameetvorming volgt. Na fusie van de gameten wordt een zygote gevormd die expandeert tot een auxospore, omgeven door een organische wand bestaande uit polysacchariden en silicaschalen. Binnen de auxospore vormt zich vervolgens een initiële vegetatieve cel met maximale grootte.^{14,18} De asexuele fase waarin de grootte afneemt, kan maanden tot jaren duren, terwijl de heropbouw slechts een aantal dagen in beslag neemt.¹⁷ Naast deze asexuele en seksuele voortplanting zijn diatomeeën in staat om rustsporen en rustcellen te produceren om zo moeilijke periodes te overleven.¹

1.1.2.2 De voortplantingscyclus van *Seminavis robusta*

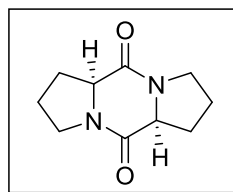
Bondoc et al. hebben de seksuele voortplanting van *S. robusta* onderzocht. Seksuele voortplanting vindt plaats rond de SST en bij *S. robusta* bedraagt deze 50 μm .²⁰ De interactie tussen de verschillende paringstypes wordt gecontroleerd door een meerstaps feromoonstelsel.²¹

De seksuele reproductie vindt plaats tussen twee verschillende paringstypes: een migrerend paringstype (MT^+) en een lokkend paringstype (MT^-) (Figuur 2). Om zich voor te bereiden op de seksuele voortplanting worden *sex inducing pheromones* (SIP) verspreid. Deze feromonen zijn conditioneringsfactoren die de cellen klaarmaken voor de voortplanting door elkaars aanwezigheid te signaleren. SIP^+ wordt afgescheiden door MT^+ en zorgt ervoor dat in MT^- de expressie van mitose-gerelateerde genen daalt en van meiose-gerelateerde genen stijgt, wat leidt tot een *cell cycle arrest* in de G_1 -fase. Vervolgens zal MT^- feromonen afscheiden die migratie van het migrerend paringstype MT^+ induceren. MT^+ zal enkel op deze feromonen reageren als het ook de aanwezigheid van de conditioneringsfactor van MT^- , SIP^- , heeft gevoeld. Dit leidt vervolgens tot paarvorming en auxosporevorming zoals eerder vermeld en ten slotte tot de vorming van initiële cellen die opnieuw asexueel kunnen delen. Zonder de conditionering door SIP zal de seksuele reproductie niet plaatsvinden. Dit zorgt ervoor dat de diatomeeën zeker zijn dat een seksuele partner aanwezig is, voordat energie geïnvesteerd wordt in de seksuele reproductie.²²



Figuur 2: Voortplantingscyclus van *Seminavis robusta* (gebaseerd op ^{21,23})

Gillard *et al.* hebben de fysiologische en metabolische veranderingen onderzocht bij de seksuele reproductie in *S. robusta* om meer te weten te komen over de structuur van het feromoon dat wordt geproduceerd door het lokkend paringstype MT⁻. Door de analyse van exometabolieten van geconditioneerde en ongeconditioneerde MT⁻ culturen werd *L*-diproline **1** geïdentificeerd als het feromoon dat verantwoordelijk is voor de aantrekking van het migrerend paringstype. Beide celculturen werden in het donker gesynchroniseerd en werden voor de biologische test in het licht geplaatst. Zowel *L*-diprolineproductie als paarvorming werden pas vijf uur na belichting waargenomen.²¹



1

1.1.3 Industriële toepassingen van diatomeeën

De interesse in diatomeeën is groot vanwege hun vele industriële toepassingen, zowel van levende als van fossiele cellen.

Diatomeeënaarde bestaat uit gefossiliseerde skeletten van diatomeeën en is 20 tot 80 miljoen jaar geleden ontstaan. Dode diatomeeën zinken naar de bodem van de zee of van een meer en worden samengedrukt tot een zachte kalkachtige steen. Na de ontginning hiervan bevat de diatomeeënaarde nog meer dan 50% water, wat moet gereduceerd worden voor verdere toepassingen. Het watergehalte wordt gereduceerd tot 2-6% en de diatomeeënaarde wordt vermalen tot deeltjes met een grootte tussen 10 en 50 μm .²⁴ Het gebruik van deze aarde is zeer uiteenlopend, waarvan hierna een aantal voorbeelden worden aangehaald. Diatomeeënaarde wordt gebruikt als filtermateriaal, onder andere in chemische bedrijven, brouwerijen en zwembaden. Door de kleine celgrootte en door de poriën in de frustule kunnen zelfs bacteriën en opgeloste deeltjes tegengehouden worden. Aangezien de cellen klein en broos zijn en een grote oppervlakte hebben, vertonen ze abrasieve effecten, waardoor ze gebruikt worden in metaalpoetsmiddelen, gezichtscrubs en tandpasta. Diatomeeënaarde wordt ook als absorberend middel toegepast om verontreinigingen te behandelen, aangezien het vloeistoffen absorbeert en vasthoudt. Ook in insecticiden vindt men vaak diatomeeënaarde terug. Doordat diatomeeën een scherpe rand hebben, zijn ze in staat het exoskelet van insecten te breken waardoor de insecten uitdrogen.²⁴⁻²⁶

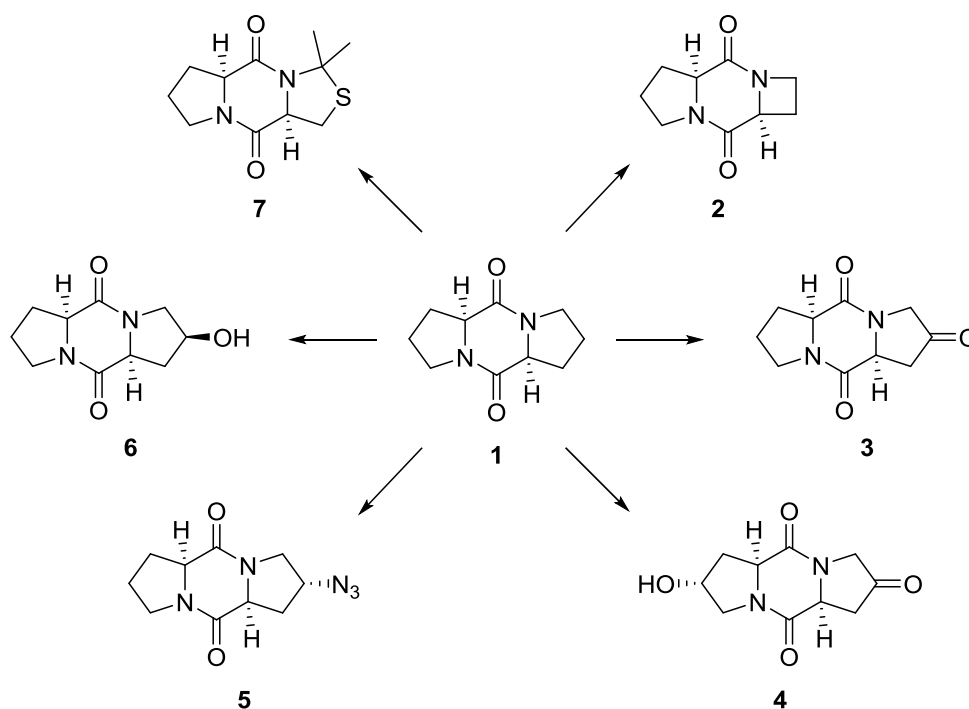
Levende cellen zijn vooral van belang voor toepassingen in de biotechnologie. Door de klimaatopwarming en de uitputting van fossiele brandstoffen is het onderzoek naar biobrandstoffen voor de toekomst belangrijk en diatomeeën zouden hierbij een mogelijke rol kunnen spelen. Hun grootste opslag van koolstof is onder de vorm van vetten, voornamelijk als triglyceriden. Deze kunnen geëxtraheerd worden om dan verwerkt te worden tot biodiesel. Zowel de lengte als de saturatiegraad van de aanwezige vetzuren wijzigen de eigenschappen van de biodiesel.²⁷ Om aan de dagelijkse behoefte van petroleum in de Verenigde Staten (VS) te voldoen, zou 5% van het landoppervlak van de VS nodig zijn indien overgeschakeld zou worden op biodiesel geproduceerd via diatomeeën, uitgaande van 3% fotosynthese-efficiëntie.^{27,28} Aangezien de fotosynthese-efficiëntie van diatomeeën hoger is dan die van planten, is er ook interesse in de thermochemische conversie van de volledige biomassa tot biobrandstof.²⁹ Daarenboven zijn diatomeeën in staat om vitamines, essentiële onverzadigde vetzuren en aminozuren te produceren, maar door de hoge productiekost is de productie hiervan beperkt.³⁰ Naast deze biotechnologische toepassingen worden diatomeeën ook gebruikt als voeder in de aquacultuur.³¹ Om deze toepassingen verder uit te bouwen en te optimaliseren, is het belangrijk om meer kennis te verkrijgen over de levenscyclus van de diatomeeën.

1.2 Doel

In deze masterthesis is het de bedoeling om meer inzicht te krijgen in de regulering van de levenscyclus van diatomeeën door onderzoek uit te voeren naar de receptor waarmee de feromonen interageren. Zoals vermeld in Sectie 1.1.2.2 is *L*-diproline **1** geïdentificeerd als het feromoon dat zorgt voor de reproductie, maar de kennis omtrent de receptor waarop dit feromoon inwerkt, is beperkt. Startende van de structuur van *L*-diproline **1**, worden zes analogen voorgesteld die interessant kunnen zijn voor het onderzoek naar de feromoonactiviteit in de receptor, bijvoorbeeld door de introductie van een kleinere ring of door de toevoeging van een functionele groep. Het is enerzijds de bedoeling om deze *L*-diproline-analogen te synthetiseren en anderzijds om deze analogen te testen op hun feromoonactiviteit in biologische testen om zo informatie te verkrijgen over hun structuur-activiteitsrelatie (SAR) met de receptor.

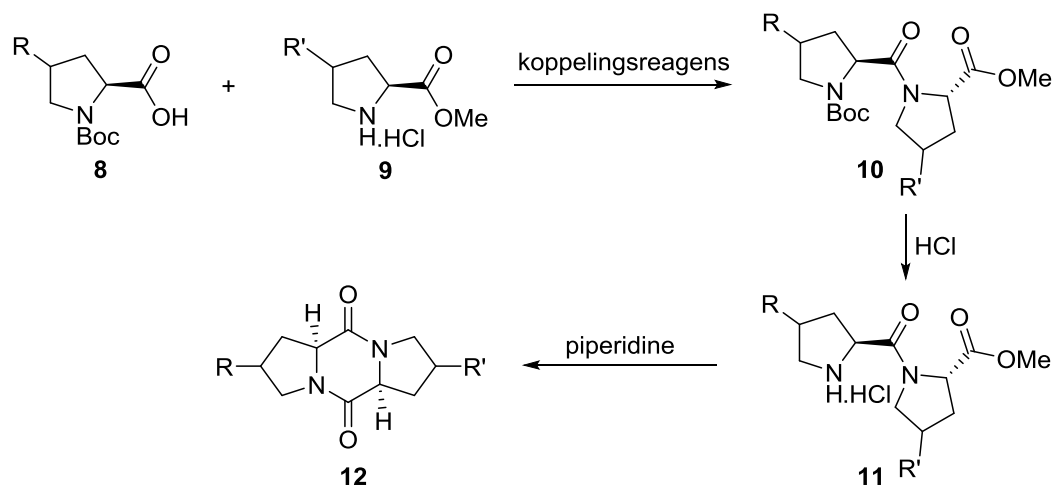
1.2.1 Synthese van de *L*-diproline-analogen

Voor de synthese van de *L*-diproline-analogen worden twee *L*-proline-analogen aan elkaar gekoppeld. De synthese van deze bouwstenen start vanuit 4-hydroxy-*L*-proline dat commercieel beschikbaar is. Eens de bouwstenen beschikbaar zijn, kan gestart worden met de synthese van de *L*-diproline-analogen. De analogen werden zo gekozen dat zowel het effect van een verschil in ringgrootte, een verschil in stereochemie, als een verschil in de grootte van de functionele groep op de feromoonactiviteit kan nagegaan worden. De gewenste analogen worden weergegeven in Figuur 3.



Figuur 3: Gewenste *L*-diproline-analogen

De synthese van de *L*-diproline-analogen **2-7** is gebaseerd op onderstaande algemene strategie (Schema 1).³² In de eerste stap worden twee *L*-proline-analogen **8** en **9** met elkaar gekoppeld met een koppelingsreagens, in dit geval *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl). Vervolgens zal onder zure omstandigheden de beschermende Boc-groep afgesplitst worden (**11**) en ten slotte zal ringsluiting plaatsvinden in basisch milieu met de vorming van het *L*-diproline-analoog **12**.



Schema 1: Algemene strategie voor de synthese van de *L*-diproline-analogen

1.2.2 Biologische testen

In het tweede deel van deze masterthesis is het de bedoeling om de feromonactiviteit van de *L*-diproline-analogen na te gaan. Dit zal gebeuren aan de hand van zowel attractie-assays als inhibitie-assays. In beide testen worden diatomeeën in een medium gebracht, waaraan vervolgens *beads* worden toegevoegd. Deze *beads* zijn respectievelijk gecoat met een *L*-diproline-analoog of met *L*-diproline **1**. In de attractie-assay zal de attractie van diatomeeën tot de *beads*, gecoat met een analoog, gemeten worden. In de inhibitie-assay wordt het *L*-diproline-analoog aan het medium toegevoegd en wordt het potentieel van het analoog om de aantrekking van de diatomeeën naar *L*-diproline gecoate *beads* te inhiberen, onderzocht. Deze testen zullen uitgevoerd worden in de laboratoria van de Vakgroep Biologie aan de Faculteit Wetenschappen. Het is de bedoeling om aan de hand van deze testen informatie te verkrijgen over de relatie tussen de feromonreceptor en de *L*-diproline-analogen.

Hoofdstuk 2

Literatuurstudie

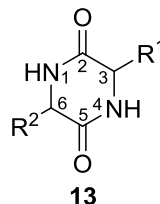
In deze literatuurstudie zal in een eerste luik het belang en de veelzijdigheid van diketopiperazinen, waarvan *L*-diproline een voorbeeld is, aangetoond worden aan de hand van hun structuur en eigenschappen. Vervolgens wordt dieper ingegaan op twee biosyntheseroutes van diketopiperazinen die in tal van organismen voorkomen. Ten slotte wordt in de literatuur gezocht naar informatie omtrent de synthese van het feromoon *L*-diproline in *Seminavis robusta*.

2.1 Diketopiperazinen

In dit deel worden de structuur en daaraan gelinkte eigenschappen van diketopiperazinen besproken. Vervolgens worden voor drie diketopiperazinen met een structuur gelijkend aan *L*-diproline, de functie en eigenschappen vermeld.

2.1.1 Algemeen

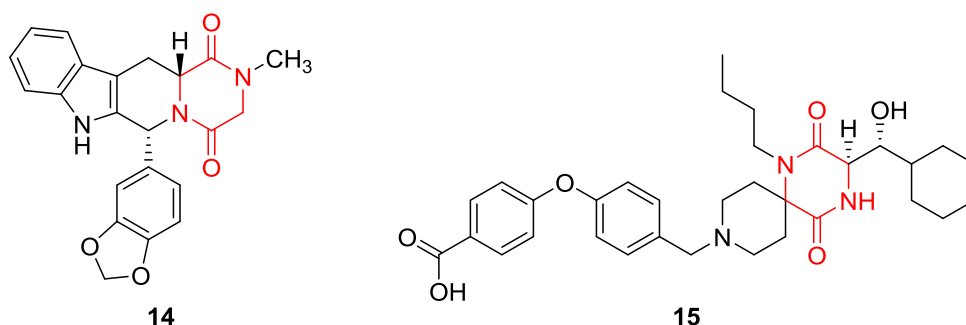
2,5-Diketopiperazinen (DKPen) **13**, ook wel cyclodipeptiden (CDPen) genoemd, zijn cyclische peptiden verkregen door de condensatie van twee α -aminozuren. Het is de eenvoudigste klasse van cyclische peptiden aangezien ze slechts twee *cis*-amidebindingen bevatten. DKPen bezitten vier posities (1, 3, 4 en 6) waarop tot zes diverse groepen kunnen geïntroduceerd worden. Op posities 3 en 6 kan de stereochemie gecontroleerd worden en dit geeft aanleiding tot de vorming van geen, één of twee chirale centra. De aanwezigheid van twee H-bindingsacceptoren en twee H-bindingsdonoren is belangrijk voor de binding aan enzymen en receptoren. Door de amidefunctie kunnen intermoleculaire bindingen (N-H...O) gevormd worden tussen nabije moleculen wat leidt tot de vorming van hogere-ordestructuren.^{33,34}



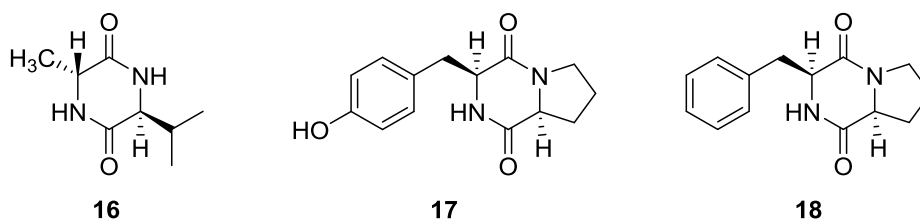
DKPen zijn flexibel aangezien de zesring zowel kan voorkomen in een vlakke vorm als in de bootvorm en deze twee vormen verschillen slechts enkele kcal/mol in energie.^{33,34} Door substitutie kan deze flexibiliteit uiteraard beperkt worden zoals het geval is wanneer de zesring gefuseerd is met de vijfing van proline. Dit resulteert in een meer rigide structuur aangezien de molecule in een stabiele bootconformatie voorkomt.³⁴

DKPen kunnen op twee verschillende manieren gesynthetiseerd worden: chemisch of via biosynthetische enzymen. Bij de chemische synthese kan dit ofwel in oplossing gebeuren ofwel via solid-phase technologie.³⁵ De enzymatische synthese kan gebeuren met niet-ribosomale peptid synthetases of met cyclodipeptid synthetases (*vide infra*). Beide enzymen komen in tal van bacteriën en fungi voor.^{33,36}

De laatste jaren is er veel onderzoek uitgevoerd naar de biologische en farmacologische activiteiten van DKPen. Door hun cyclische structuur bezitten DKPen minder conformationele vrijheid wat resulteert in een grotere chemische en enzymatische stabiliteit. Zo is hun gevoeligheid voor proteolyse laag en bezitten ze een conformationele rigiditeit wat hun vermogen om met receptoren te binden verbetert. Door hun cyclische structuur bezitten ze een hogere selectiviteit voor receptoren dan lineaire moleculen, wat bijdraagt aan hun belang als farmacofoor. Ook de mogelijkheid om verschillende substituenten te introduceren op het DKP-skelet, maakt ze aantrekkelijk voor geneesmiddelenonderzoek.^{33,37,38} Verscheidene geneesmiddelen werden ontwikkeld met een DKP in de structuur zoals tadalafil **14** en aplaviroc **15**, die respectievelijk gebruikt worden voor de behandeling van pulmonale arteriële hypertensie en de behandeling van HIV.³⁹ Ook gebeurt er veel onderzoek naar DKPen als antikankergeneesmiddelen, geneesmiddelen tegen *multidrug*-resistente bacteriën, *broad-range* antibiotica en anti-inflammatoire geneesmiddelen.³³



Niettegenstaande er al veel DKPen uit organismen werden geïsoleerd en geïdentificeerd, is nog weinig gekend over hun functie in de producerende organismen. Zo komen DKPen voor bij microbiologische oorlogsvoering of bij biochemische communicatie zoals quorum sensing of interspecies signaling.³³ Bij *Pseudomonas aeruginosa* zijn cyclo(*D*-Ala-*L*-Val) **16** en cyclo(*L*-Pro-*L*-Tyr) **17** van belang voor de activatie van een biosensor bij bioluminescentie, terwijl dit bij *Pseudomonas fluorescens* en *Pseudomonas alcaligenes* cyclo(*L*-Phe-*L*-Pro) **18** is.²²

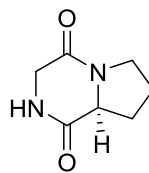


Het is duidelijk dat DKPen veel interesse opwekken door onder andere hun antifungale,^{40,41} antivirale,⁴¹ antibacteriële,⁴² neuroprotectieve⁴³ en anti-inflammatoire³⁷ eigenschappen. Aan de hand van een aantal voorbeelden van DKPen zal hun veelzijdigheid verduidelijkt worden. De keuze van deze voorbeelden is gebaseerd op hun structurele gelijkenis met het feromoon van *S. robusta*.³⁸

2.1.2 Diketopiperazinen in de natuur

2.1.2.1 Cyclo(Gly-L-Pro)

Cyclo(Gly-L-Pro) (cGP) **19** is een DKP waarbij glycine en proline zijn gekoppeld. Dit DKP werd teruggevonden bij *Bacillus pumilus*, een Gram-positieve bacterie die voorkomt in de bodem. Ook bij mensen wordt cGP teruggevonden. Het wordt verkregen vanuit de *N*-terminus van de *insulin-like growth factor-1* (IGF-1). Bij het splitsen van IGF-1 worden des-IGF-1 en *N*-terminaal tripeptide (GPE) bekomen. Dit tripeptide is opgebouwd uit glycine-proline-glutamaat en cGP wordt als een metaboliet hiervan verkregen.^{44,45}



19

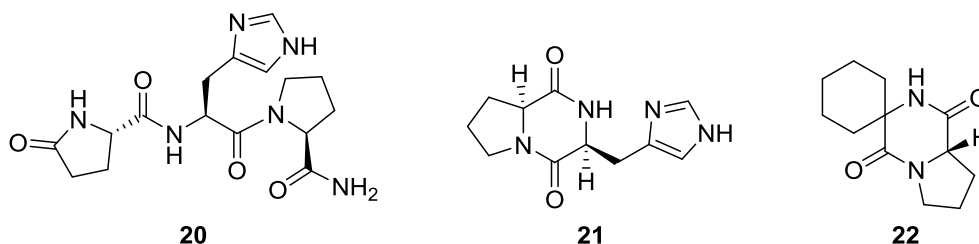
Ferro et al. zijn het effect van cGP op de hersenactiviteit bij muizen nagegaan door ze bloot te stellen aan verschillende pijnmodellen.³⁷ Het doel was om de antinociceptieve (tegen weefsel pijn) en anti-inflammatoire effecten van cGP te onderzoeken. Om het antinociceptief effect na te gaan, werd formaline geïnjecteerd in de poten van de muis met als meetbare respons het likken van de poten. cGP deed de nociceptieve respons dalen en het maximale effect van cGP vond plaats twee tot vier uur na de formalinebehandeling. Ook een hete plaat test werd uitgevoerd en daaruit bleek dat het effect voor twee cGP-concentraties (1 en 10 $\mu\text{mol/L}$) vergelijkbaar was met morfine. Het anti-inflammatoir effect werd nagegaan door carrageen in te spuiten in de poten van de muis. Door het toedienen van cGP werd een daling van de inflammatie waargenomen. Samengevat heeft cGP zowel een effect op chemische als hitte-geïnduceerde pijn en werkt zowel antinociceptief als anti-inflammatoir.³⁷

2.1.2.2 Cyclo(L-His-L-Pro)

Traumatic Brain Injury is een acuut hersenletsel dat gelinkt is aan hoofdwonden veroorzaakt door bijvoorbeeld een auto-ongeval, een vuurwapen of een val. De symptomen variëren van persoon tot persoon en kunnen zich uiten op cognitief vlak, zoals verwarring en impulsiviteit, maar patiënten kunnen ook spraak- en taalproblemen vertonen en symptomen kunnen zich ook op zintuiglijk vlak uiten, zowel op zicht, gehoor, smaak als geur.⁴⁶ Door deze wijdverspreide symptomen is het moeilijk om een geneesmiddel te ontwikkelen dat alle symptomen kan onderdrukken. Een

effectieve behandeling impliceert dan ook het gebruik van een hele resem geneesmiddelen die op verschillende factoren inwerken.⁴¹

Thyrotropin-releasing hormoon (TRH) **20** is een voorbeeld van een geneesmiddel dat op verschillende factoren tegelijk inwerkt, maar aan het gebruik van TRH zijn nadelige fysiologische effecten verbonden die het potentieel ervan beperken. Het product dat ontstaat na metabolisatie is cyclo(*L*-His-*L*-Pro) **21** en *Faden et al.* zijn het effect van verbindingen afgeleid van cyclo(*L*-His-*L*-Pro) nagegaan. Daaruit bleek dat verbinding **22** goede effecten vertoont voor de hersenen.⁴¹

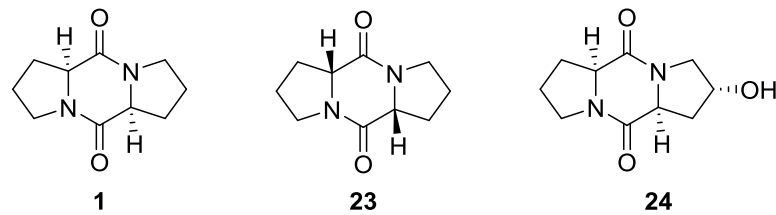


Verscheidene *in vitro* testen werden uitgevoerd op ratten om het effect van toediening van verbinding **22** op motorische en cognitieve functies na te gaan. Hieruit bleek dat de cognitieve en motorische functies verbeteren en dat het afsterven van hersencellen significant afneemt, wat duidt op de beschermende effecten van **22** op de hersenen.⁴¹

2.1.2.3 Cyclo(*Pro-Pro*)

Wu et al. zijn het effect nagegaan van cyclo(*L*-Pro-*L*-Pro) **1** en cyclo(*D*-Pro-*D*-Pro) **23**, algemeen afgekort als cPP, op het verdedigingsmechanisme van de tabaksplant *Nicotiana benthamiana*.⁴⁷ Deze componenten werden geselecteerd op basis van een eerder uitgevoerd onderzoek door *Chen et al.* naar de metabolieten van de schimmel *Eupenicillium brefeldianum*. In dit onderzoek werden acht verschillende DKPen geïdentificeerd als componenten die mogelijk resistentie ten opzichte van pathogenen induceren in planten. De meest veelbelovende component was het *trans*-hydroxy-*L*-prolinederivaat **24**.⁴⁸

Een blad van de tabaksplant werd op een bepaalde plaats met cPP behandeld en daarna werd de andere zijde van het blad met de schimmel *Phytophthora nicotianae* geïnoculeerd. Na 48 uur werd vastgesteld dat de behandelde bladeren veel minder schade hadden ondervonden van de schimmel dan de controlebladeren. Na zeven dagen werd ook het effect van het Tabaksmozaïekvirus op de plant nagegaan en ook hier bleek dat de behandelde bladeren veel minder besmet waren met het virus. cPP activeert onder andere de sluiting van de huidmondjes en de productie van reactieve zuurstofverbindingen, die de plant beschermen tegen pathogenen. Om te achterhalen welke signalisatie-*pathway* hiervoor verantwoordelijk was, werd de genexpressie onderzocht. Hieruit heeft men afgeleid dat een gen dat gelinkt is aan de salicylzuur (SA) signalisatie-*pathway* opgereguleerd wordt in bladeren die behandeld werden met cPP. SA is één van de best gekende signalisatiemoleculen in planten en speelt een belangrijke rol bij de systemische resistentie van planten tegenover pathogenen.⁴⁷



Verscheidene CDPen, waaronder cPP, werden geïdentificeerd bij melkzuurbacteriën, een klasse van bacteriën die belangrijk zijn in fermentaties. Deze CDPen vertonen antifungale activiteit, wat in de toekomst mogelijk zou kunnen gebruikt worden in voedselconservering.⁴⁰ cPP werd ook geïdentificeerd bij de mariene spons *Callyspongia sp.*⁴⁹ en is mogelijk medeverantwoordelijk voor de bittere smaak van geroosterde koffie.⁵⁰

2.2 Biologische synthese van cyclodipeptiden

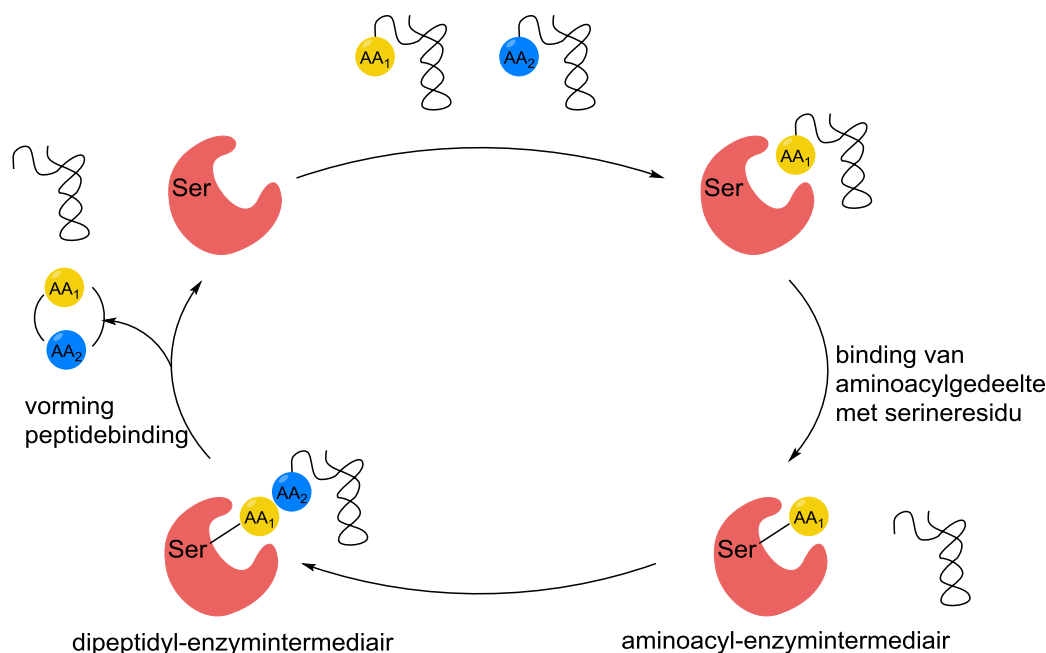
In dit deel worden twee biosynthetische routes van cyclodipeptiden besproken: cyclodipeptidesynthases (CDPS's) en niet-ribosomale peptidesynthetases (NRPS's).⁵¹ Tot 15 jaar geleden was enkel de laatstgenoemde route gekend, maar in 2002, met de ontdekking van AlbC (*vide infra*), werden de CDPS's geïdentificeerd.⁵² CDPS's zijn kleine enzymen die uit een 200-tal aminozuren bestaan en specifiek zijn voor canonieke aminozuren, terwijl NRPS's grote enzymen zijn die uit verschillende modules bestaan en een brede waaier aan substraten kunnen binden. NRPS's werden in bacteriën en fungi teruggevonden en CDPS's werden zowel in bacteriën en fungi, als in protozoa en dieren geïdentificeerd.⁵³

2.2.1 Cyclodipeptidesynthase (CDPS)

Cyclodipeptidesynthasen (CDPS's) behoren tot een recent ontdekte familie van enzymen die gebruikmaken van aminoacyl-tRNA's (aa-tRNA's) en de transfer van aminozuren van tRNA's katalyseren met de vorming van cyclodipeptiden.^{53,54}

2.2.1.1 Algemeen

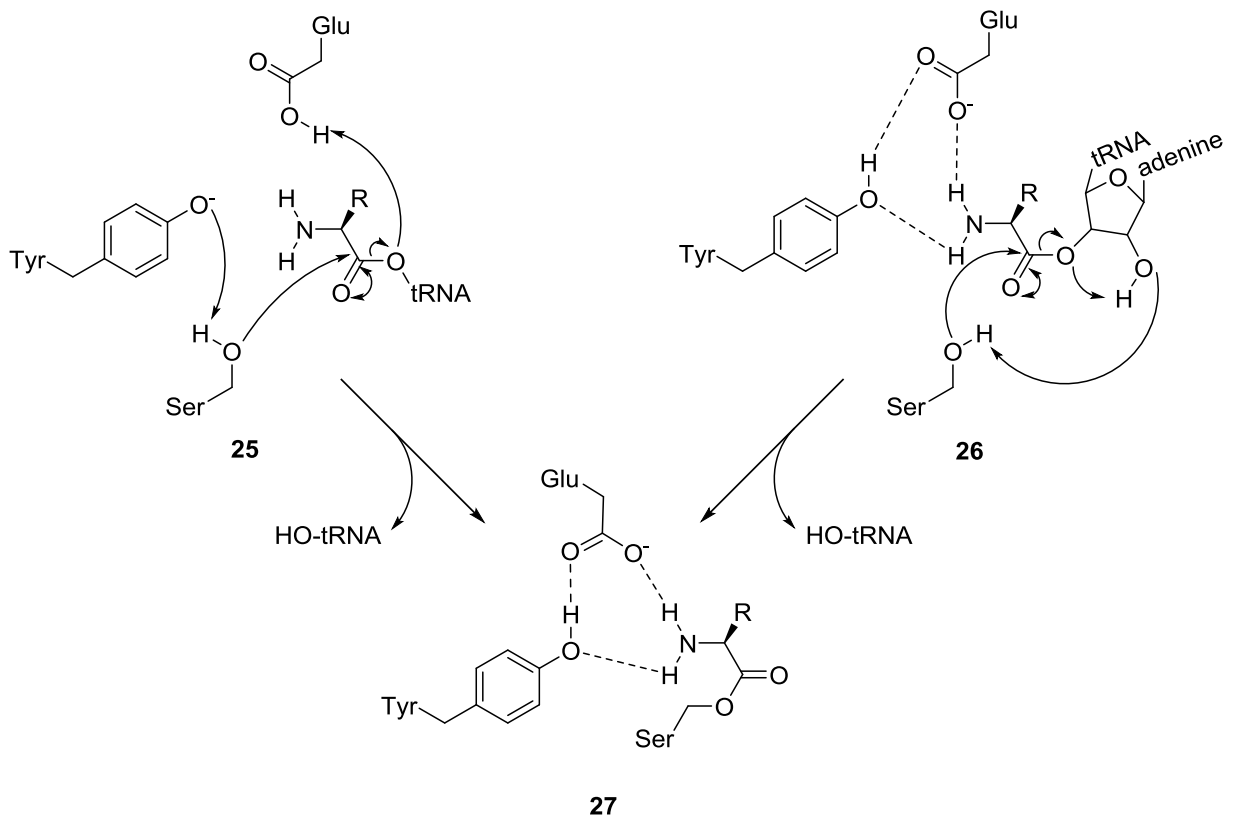
CDPS's kunnen aa-tRNA's binden en de aminozuren koppelen tot cyclodipeptiden met behulp van een pingpong gekatalyseerd mechanisme (Figuur 4). Het aminoacylgedeelte van het eerste aa-tRNA wordt overgebracht naar een geconserveerd serineresidu op het enzym, wat resulteert in de vorming van een aminoacyl-enzymintermediair. Dit intermediair herkent een tweede aa-tRNA en reageert met het aminoacylgedeelte hiervan wat een dipeptidyl-enzymintermediair oplevert. Intramoleculaire ringsluiting vindt plaats met behulp van een geconserveerd tyrosineresidu, waarna het CDP vrijkomt van het enzym.^{51,55,56} Genen voor CDPS's werden teruggevonden in meer dan 40 bacteriën en bij minstens vier *Fusarium* species.⁵¹



Figuur 4: Overzicht van het pingpong gekatalyseerd mechanisme bij CDPS's (gebaseerd op ⁵¹)

Aa-tRNA's worden met behulp van aminoacyl-tRNA synthetase gesynthetiseerd uit een aminozuur, ATP en tRNA. Aa-tRNA's worden voornamelijk gebruikt voor de synthese van proteïnen met behulp van ribosomen, maar een deel wordt weggeplukt door CDPS's voor de synthese van cyclodipeptiden.⁵³ CDPS's bevinden zich daardoor tussen het primair en secundair metabolisme, aangezien ze geladen tRNA's wegnemen van het primair metabolisme om te gebruiken voor de synthese van cyclodipeptiden in het secundair metabolisme.⁵³

Het katalytische serineresidu dat belangrijk is bij de vorming van het aminoacyl-enzymintermediair, wordt geactiveerd door deprotonatie van de hydroxylgroep, zodat deze kan reageren als nucleofiel. Twee mogelijke mechanismen worden beschreven in de literatuur (Schema 2). Enerzijds zou een hydroxylgroep van een geconserveerd tyrosineresidu kunnen deelnemen aan de activatie door het wegplukken van een proton van de hydroxylgroep van serine (**25**). Anderzijds zou de activatie kunnen optreden door een *proton shuttle* met twee nabijgelegen hydroxylgroepen van nucleotide A⁷⁶ van het tRNA-gedeelte (**26**).^{53,57} Zowel E182 (glutaminezuur) als Y178 (tyrosine), beide in de *active site pocket*, spelen een belangrijke rol in de positionering van de α -aminogroep.⁵⁷



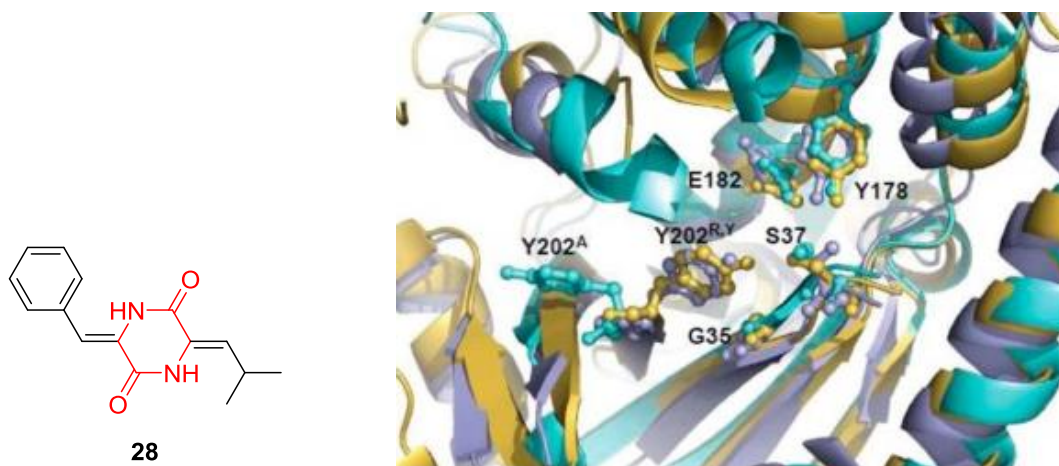
Schema 2: Activatie van het katalytisch serineresidu; Links wordt het mechanisme weergegeven waarbij tyrosine zorgt voor de activatie; Rechts wordt de activatie door een proton shuttle van het tRNA-gedeelte weergegeven. (gebaseerd op ⁵⁷)

De aa-tRNA's binden op verschillende plaatsen op het enzym. Het aminoacylgedeelte van het eerste aa-tRNA bindt met *pocket* P1 die structurele gelijkenissen vertoont met het aminozuur. Het tRNA-gedeelte interageert met basische residuen op de α 4-helix en dit initieert de cyclus. Deze binding treedt op door ionische interacties tussen het negatief geladen ribosefosfaat van het tRNA en de positief geladen α 4-helix.⁵⁶⁻⁵⁸ De specificiteit wordt bepaald door het aminoacylgedeelte. Het aminoacylgedeelte van het tweede aa-tRNA bindt met *pocket* P2, een bredere *pocket* dan P1, en het tRNA-gedeelte interageert met residuen op de α 6- α 7-lus. Hierbij wordt de specificiteit zowel bepaald door het aminoacylgedeelte als door het tRNA-gedeelte, in het bijzonder door het N¹-N⁷² basenpaar.^{56,58,59} CDPS's synthetiseren voornamelijk cyclodipeptiden met de volgende aminozuren: fenylalanine, leucine, tyrosine, methionine en tryptofaan.⁵⁸

Op dit moment zijn 51 verschillende CDPS's gekend.⁵⁸ Slechts vijf biosynthetische routes zijn op dit moment opgehelderd, namelijk deze voor de synthese van de antibiotica albonoursin en mycocyclosin, het siderochroom pulcherrimin, de nocazine familie en gemethyleerde ditryptofaan CDPen.⁵⁷ Zowel bij bacteriële fyta, zoals de Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Cyanobacteria, Firmicutes en Proteobacteria, als bij eukaryotische fyta, zoals de Ascomycota, Annelida, Ciliophora en Cnidaria, werden CDPS's geïdentificeerd.⁵⁷ *Parachlamydia acanthamoeba* en *Candidatus Protochlamydia amoebophila* zijn twee voorbeelden van organismen die diproline synthetiseren via CDPS's.⁵⁸

2.2.1.2 Katalytische residuen

CDPS's zijn meestal 200 tot 300 aminozuurresiduen lang, waarbij er zes katalytische residuen aanwezig zijn: N40 (asparagine), Y178 (tyrosine), E182 (glutaminezuur), H203 (histidine), S37 (serine) en Y202 (tyrosine), waarvan de eerste drie meestal geconserveerd zijn en de laatste twee sterk geconserveerd zijn (Figuur 5).^{54,56,58} De gehanteerde nummering is gebaseerd op AlbC, het eerste CDPS dat ontdekt werd. *Lautry et al.* hebben dit CDPS in 2002 aangetroffen in *Streptomyces noursei* en het staat in voor de vorming van cyclo(*a,b*-dehydroPhe-*a,b*-dehydroLeu) **28**, albonoursin (AlbC) genoemd.⁵²



Figuur 5: Links: Structuur van albonoursin; Rechts: Overzicht van de positie van de katalytische residuen in de active site pocket van een CDPS⁵³

In AlbC vormt het sterk geconserveerde residu Y202 een waterstofbrugnetwerk dat belangrijk is voor de goede positionering van de katalytische residuen. Hierbij spelen ook N40 en H203 een belangrijke rol. Dit is het geval voor ongeveer de helft van de CDPS's. Bij de andere helft zijn X40 (een niet-geconserveerd residu) en P203 (proline) samen met Y202 medeverantwoordelijk voor de goede positionering. Op basis van de aanwezige katalytische residuen volgt de opdeling van de CDPS's in twee klassen: NYH en XYP. Mogelijk bestaat er ook nog een derde klasse, SYQ, waarbij S40 (serine), Q203 (glutamine) en Y202 de katalytische residuen vormen. De XYP-subfamilie is meer divers dan de NYH-subfamilie en gebruikt een grotere set van aminozuren voor de bouw van CDPen, namelijk 16 ten opzichte van 10.⁵⁸

2.2.1.3 Tailoring-enzymen

CDPS's worden normaal gezien geassocieerd met cyclodipeptide *tailoring*-enzymen, wat erop wijst dat het oorspronkelijk CDP nog verder wordt gemodificeerd.^{57,58} Echter, deze modificaties vinden enkel plaats na cyclodipeptidevorming, in tegenstelling tot NRPS's waarbij ook het substraat kan gemodificeerd worden. Dit leidt tot een grotere complexiteit in cyclodipeptiden gesynthetiseerd door NRPS's dan door CDPS's.⁵³

Deze bijhorende modificatie-enzymen kunnen sterk variëren, maar vaak worden oxidoreductasen, hydrolasen, ligasen en transferasen teruggevonden. Oxidasen komen het meeste voor als *tailoring*-enzymen, waaronder zeven verschillende types van cytochroom P450, vijf verschillende

types van α -ketoglutaraat/ Fe^{2+} -afhankelijke oxygenases en drie verschillende flavinebevattende mono-oxygenasen.⁵⁷

2.2.2 Niet-ribosomaal peptidesynthetase (NRPS)

De synthese van CDPen kan ook verlopen met behulp van NRPS's die, in tegenstelling tot de geacyleerde aminozuren voor CDPS's, gebruikmaken van vrije aminozuren. NRPS's kunnen een brede waaier aan substraten binden en kunnen diverse peptiden synthetiseren met een lineaire, vertakte of cyclische structuur.⁶⁰ De gesynthetiseerde peptiden bezitten antibacteriële, cytostatische, antivirale en antitumor-eigenschappen en hebben dus een belangrijke farmacologische werking.⁶¹ NRPS's zijn verantwoordelijk voor o.a. de synthese van penicilline en cefalosporine.⁵¹

2.2.2.1 Algemeen

NRPS's zijn opgebouwd uit verschillende modules en elke module is verantwoordelijk voor een volledige cyclus van polypeptideketenverlenging en bijhorende modificaties. De meeste NRPS's zijn opgebouwd uit vier tot tien modules, maar zelfs NRPS's met 50 modules zijn geïdentificeerd. Elke module is opgebouwd uit minimale of noodzakelijke domeinen en een aantal optionele domeinen, waarbij elke module bijdraagt tot de incorporering van één aminozuur.^{62,63}

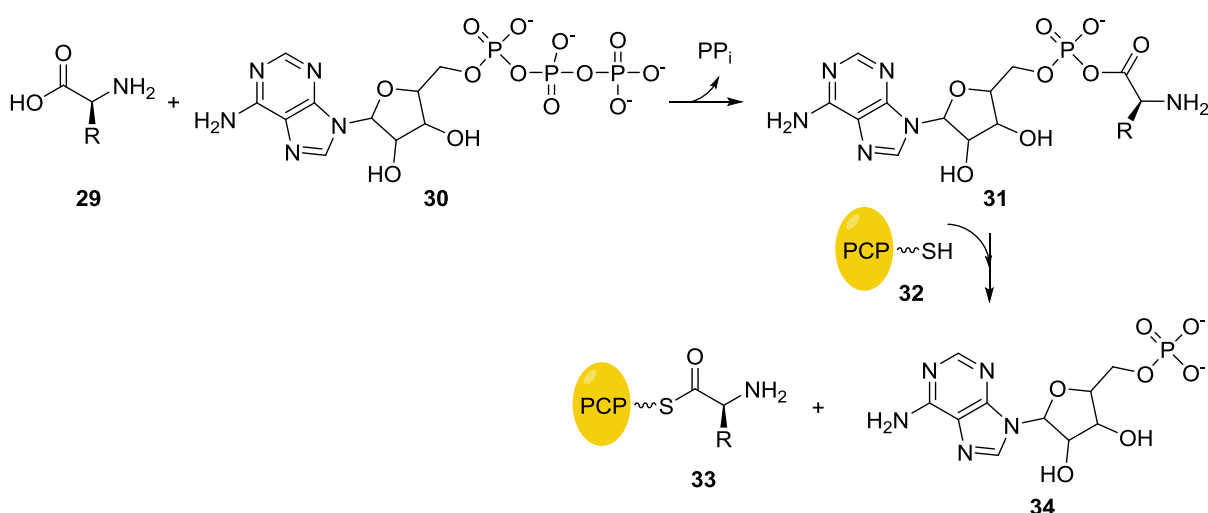
NRPS's komen voor als grote complexen waarin vier belangrijke noodzakelijke katalytische domeinen kunnen onderscheiden worden: het adenyleringsdomein (A), het thiolatiedomein (T), het condensatiedomein (C) en het thioesterasedomein (TE).^{51,61} Het A-domein staat in voor de selectie, activatie en transfer van het aminozuur door adenylering met ATP. Vervolgens zal het T-domein, ook wel het peptidyl *carrier* proteïne-domein (PCP) genoemd, het aminozuur covalent binden aan het thiol van de cofactor 4'-fosfopantetheine (4'-Ppant) met een thioesterbinding om het dan te transporteren naar het C-domein. In dit laatste domein wordt de vorming van peptidebindingen tussen aangrenzende monomeren van het NRPS-complex gekatalyseerd. Bovendien staat dit domein mogelijk in voor de communicatie tussen de verschillende modules.⁶¹ Na vorming van het peptide wordt de thioesterbinding verbroken door hydrolyse, cyclisatie of overdracht naar een functionele groep in het thioesterasedomein (TE).⁶⁰ Gelet op de grote variatie aan gesynthetiseerde peptiden is het vanzelfsprekend dat modificaties zoals reductie, methylering en epimerisatie kunnen optreden.^{51,64,65} Het antibioticum prodigiosin, gesynthetiseerd door *Serratia marcescens*, is een voorbeeld van een peptide waarvan de synthese gekatalyseerd wordt door een NRPS. Voor deze biosynthese vormt *L*-proline, naast *L*-serine en glycine, een substraat.⁶⁶

2.2.2.2 Adenyleringsdomein en peptidyl carrier proteïne-domein

Zoals eerder vermeld staat het A-domein in voor de selectie, activatie en transfer van het aminozuur en het is in staat om meer dan 500 verschillende monomeren te activeren.⁶⁷ Het is opgebouwd uit 550 aminozuren, terwijl het PCP-domein uit slechts 100 aminozuren bestaat.^{60,61} Het A-domein behoort tot een grote superfamilie van adenylaatvormende enzymen waartoe ook

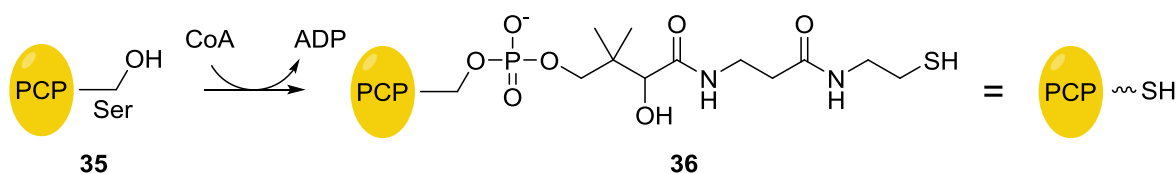
de luciferasen en acetyl-CoA synthetasen behoren. Alle leden van deze superfamilie hebben sterk geconserveerde sequenties die belangrijk zijn voor de ligandbinding.^{61,64}

Tijdens de activatie van het monomeer wordt een geactiveerd aminoacyl AMP-adenylaats **31** gevormd door een nucleofiele aanval van de negatief geladen carboxylaatsgroep van het aminozuur **29** op de α -fosfaatgroep van ATP **30** met uitstoot van pyrofosfaat (PP_i) (Schema 3). Het A-domein is het enige domein dat afhankelijk is van een externe cofactor, namelijk ATP.^{64,67,68} Door deze activatie en de daaropvolgende rotatie van het A-domein, ontstaat er een opening waardoor de 4'-Ppant-arm **32** van het PCP-domein het geactiveerde monomeer kan bereiken. De thiolgroep van de arm valt aan op de carbonylgroep van het monomeer **31** en bindt dit met een thioesterbinding, waarbij AMP **34** wordt vrijgesteld en het gebonden monomeer **33** wordt gevormd.^{64,67} Op die manier vormt het PCP-domein een shuttle voor de substraten tussen het A- en het C-domein.⁶⁹



Schema 3: In de eerste stap wordt de activatie van het aminozuur weergegeven die plaatsvindt in het A-domein. In de tweede stap wordt de overdracht van het geactiveerd aminozuur op het PCP-domein weergegeven. (gebaseerd op ⁶⁷)

Het PCP-domein moet op zich ook geactiveerd worden en dit kan door de transfer van 4'-Ppant van Coenzyme A (CoA) naar een geconserveerd serineresidu op dit domein (Schema 4). De fosfodiesterbinding van CoA wordt aangevallen door de zijketen van het serineresidu **35** met vorming van een actief domein met een nucleofiele terminale thioaatgroep **36**, wat gekatalyseerd wordt door een 4'-Ppant transferase. Zo wordt het domein omgezet van de inactieve apovorm **35** naar de actieve holovorm **36**.^{62,69} Het serineresidu is dus essentieel voor de binding van 4'-Ppant en bijgevolg ook voor de binding van het geactiveerde aminozuur aan 4'-Ppant.^{61,70}



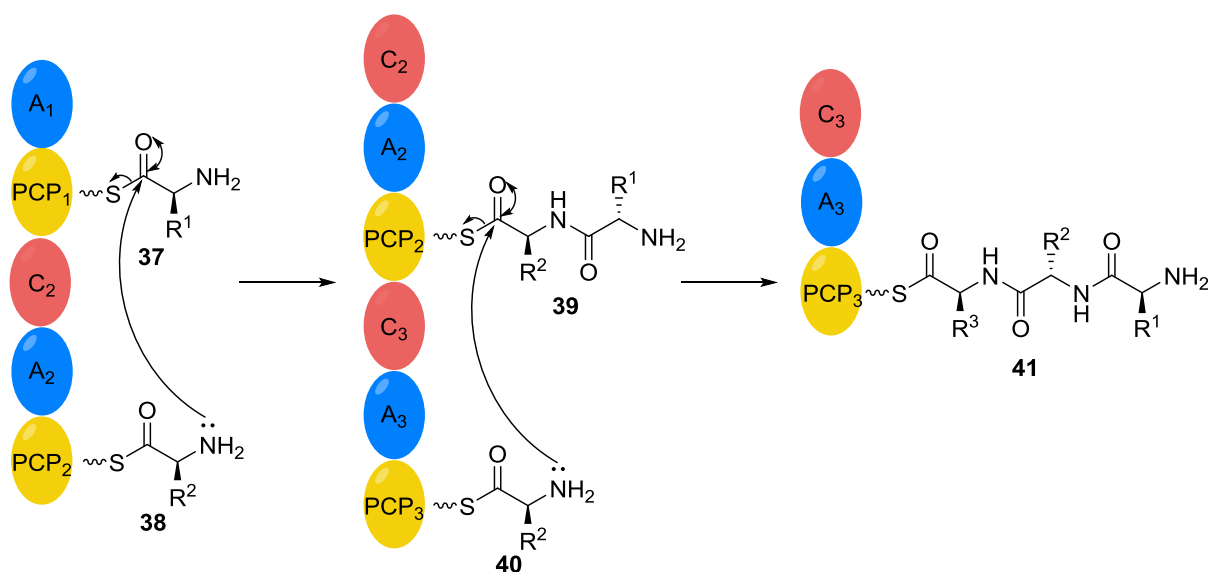
Schema 4: Activatie van het serineresidu van het PCP-domein (gebaseerd op ⁶⁹)

Het A-domein is vaak afhankelijk van kleine proteïne-activatoren die de activiteit van NRPS's regelen zonder dat afbraak en heropbouw van de volledige machinerie nodig is. Echter, hierover is er nog veel onduidelijkheid en verder onderzoek is noodzakelijk om dit op te helderen.⁶⁷

2.2.2.3 Condensatiedomein

Het C-domein komt niet in alle modules voor. Er zijn twee soorten modules, namelijk initiatie- en elongatiemodules, die respectievelijk uit een A- en T-domein, en een A-, T- en C-domein bestaan.^{63,71} Het C-domein, opgebouwd uit 450 aminozuren, katalyseert de vorming van een amidebinding tussen een *upstream* peptidyl/aminoacylthioester en een *downstream* aminozuurgroep, beide aanwezig op verschillende PCP's.^{64,69,71} Het gewenste peptide wordt opgebouwd vanaf de eerste module, de initiatiemodule, tot de laatste elongatiemodule, door opeenvolgende transpeptidaties van substraten op verschillende modules, die zorgen voor ketenverlenging van N-terminale naar C-terminale richting.^{62,71}

Bij de start zal het aminozuur dat aanwezig is op de 4'-Ppant-arm van de initiatiemodule **37** door een *swing* in de donorsite van het C-domein van de eerste elongatiemodule geplaatst worden en het tweede aminozuur **38**, aanwezig op de 4'-Ppant-arm van de eerste elongatiemodule, wordt op dezelfde manier in de acceptorsite van deze module geplaatst, wat gevolgd wordt door een amidebinding tussen deze twee aminozuren (**39**) (Schema 5).^{63,71} Vervolgens vindt dezelfde reactie plaats tussen de ketens op de eerste en tweede elongatiemodule en dit wordt verdergezet tot de laatste elongatiemodule bereikt is. Algemeen zal een binding gevormd worden tussen een *upstream* donorsubstraat, een peptidyl-S-PCP, en een *downstream* acceptorsubstraat, een aminoacyl-S-PCP. Dit laatste gedraagt zich als een nucleofiel en valt aan op het donorsubstraat met vorming van een amidebinding. Op deze manier katalyseert het C-domein de ketenverlenging.^{62,63} Uit studies blijkt dat een histidineresidu belangrijk is bij deze ketenverlenging aangezien het de α -aminogroep van het acceptorsubstraat goed positioneert voor de nucleofiele aanval.⁷² Het acceptorsubstraat komt tijdens de reactie mogelijk voor als een zwitterionisch intermediair en histidine zou hiervoor bovendien van belang kunnen zijn als base voor het opvangen van het proton.^{67,71,72}



Schema 5: Vorming van de peptideketen in het C-domein (gebaseerd op ⁶⁹)

Het C-domein is selectief voor de stereochemie van de aminozuren die aan elkaar gelinkt worden. Voor het acceptoraminozuur is een *L*-configuratie noodzakelijk, terwijl het donorsubstraat zowel een *L*- als een *D*-configuratie kan bezitten, afhankelijk van het C-domein. Dit toont aan dat de aanwezigheid van een epimerisatiedomein, dat een *L*-aminozuur kan omzetten naar de *D*-configuratie noodzakelijk is, aangezien het A-domein enkel *L*-aminozuren activeert.^{63,67}

2.2.2.4 Thioesterasedomein

Het TE-domein komt enkel voor in terminale modules en zorgt voor de afsplitsing van de gesynthetiseerde peptide van de 4'-Ppant-arm.⁷³ Dit gebeurt in een tweestapsmechanisme waarbij er eerst een transfer plaatsvindt van de peptideketen aan het C-terminale PCP-domein naar een geconserveerd serineresidu in het TE-domein met vorming van een peptidyl-O-TE intermediair. In de tweede stap wordt de keten afgesplitst van het TE-domein met regeneratie van het NRPS. Bijgevolg vindt er eerst een acylering van serine plaats, gevolgd door een deacylering.^{62,73,74} Het serineresidu maakt deel uit van een katalytische triade in het actieve centrum van het TE-domein, bestaande uit serine, histidine en asparaginezuur.^{73,75}

Sommige TE-domeinen katalyseren de synthese van lineaire peptiden door hydrolyse, terwijl andere domeinen de reactie met een intramoleculair nucleofiel katalyseren met cyclisatie tot gevolg.⁷³ In het laatste geval kan ofwel een *N*-terminale aminogroep ofwel een nucleofiel op een zijketen als nucleofiel optreden. Het groot aantal cyclisatiemogelijkheden leidt tot een brede waaier aan peptiden.⁷⁴ Bovendien heeft het TE-domein ook nog een *housekeeping*-functie door het hydrolyseren van foutief geacylerde monomeren of acylketens.⁶²

2.2.2.5 Tailoring domeinen

Zoals eerder vermeld zijn er ook optionele domeinen aanwezig in NRPS's. In het epimerisatiedomein wordt de chiraliteit van het laatst toegevoegde aminozuur omgedraaid van de *L*- naar de *D*-configuratie. Het *N*-methyleringsdomein transfereert een methylgroep van S-

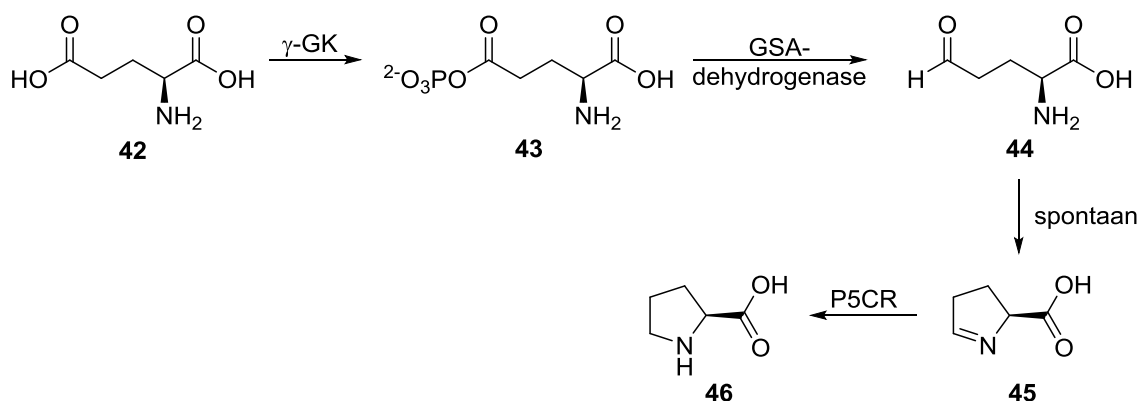
adenosylmethionine naar de α -aminogroep van een aminozuur. Het cyclisatiedomein katalyseert interne cyclisatie van cysteïne-, serine- of threonine-eenheden tot oxazoline of thiazolinerings. Bovendien bestaan er ook *tailoring* enzymen die monomeren kunnen modifieren door acylering, glucosylering, hydroxylering of halogenatie.^{51,62,65} Deze enzymen zijn voornamelijk belangrijk voor peptiden die *D*-aminozuren of *N*-gemethyleerde aminozuren bevatten.⁶¹

2.3 Biologische synthese van *L*-proline en *L*-diproline in *Seminavis robusta*

In het laatste deel wordt de biologische synthese van *L*-proline **46** en *L*-diproline **1** besproken. De seksuele reproductie in *S. robusta* is zowel afhankelijk van SIP voor de conditionering, als van het feromoon *L*-diproline **1** voor de voortplanting zelf. Men gaat ervan uit dat de genen die verantwoordelijk zijn voor de *L*-diprolineproductie worden opgeregeerd na afscheiding van de conditioneringsfactor SIP⁺ door MT⁺.^{21,65} Om na te gaan welke enzymen bijdragen tot de productie van *L*-diproline werd een *S. robusta* cultuur geconditioneerd met SIP⁺. Na conditionering werden geen NRPS- of CDPS-homologen geïdentificeerd, maar er werd wel een verhoogde activiteit van twee enzymen gemeten die gelinkt zijn aan de *L*-proline-synthese. Ook werd een stijging doorheen de tijd waargenomen van het transcript voor een bifunctioneel esterase dat mogelijk een rol speelt in de feromoonproductie.^{23,76}

2.3.1 *L*-proline

Al in 1952 werd een voorstel gedaan omtrent de syntheseroute van *L*-proline in *E. coli*, maar bevestiging van deze route heeft, o.a. door de instabiliteit van het eerste intermediair, 40 jaar geduurd. *L*-proline wordt gesynthetiseerd uit *L*-glutamaat door een bifunctioneel Δ 1-pyrroline-5-carboxylaatsynthetase (P5CS) en Δ 1-pyrroline-5-carboxylaatreductase (P5CR) (Schema 6). In de eerste stap van de synthese treedt een fosforylering met ATP op van de carboxylgroep van *L*-glutamaat **42** tot γ -glutamylfosfaat **43** door γ -glutamylkinase (γ -GK). Dit wordt op zijn beurt gereduceerd tot glutaminezuur- γ -semialdehyde **44** (GSA) met GSA-dehydrogenase. Beide enzymen komen voor in P5CS. Vervolgens vindt een spontane cyclisatie plaats, gevolgd door een reductie tot *L*-proline **46** door P5CR.^{23,77} *L*-proline wordt in planten op dezelfde manier aangemaakt om osmotische stress, door droogte of hoge saliniteit, tegen te gaan.⁷⁸



Schema 6: Synthese van L-proline vanuit L-glutamaat

In *S. robusta* werden de enzymen die deze synthese katalyseren teruggevonden bij de analyse van medium na SIP⁺-conditionering. P5CS werd opgereguleerd met een grote stijging drie uur na de toediening. Ook de expressie van P5CR was duidelijk hoger drie uur na de toediening in vergelijking met de onbehandelde cultuur.^{23,76}

2.3.2 L-diproline

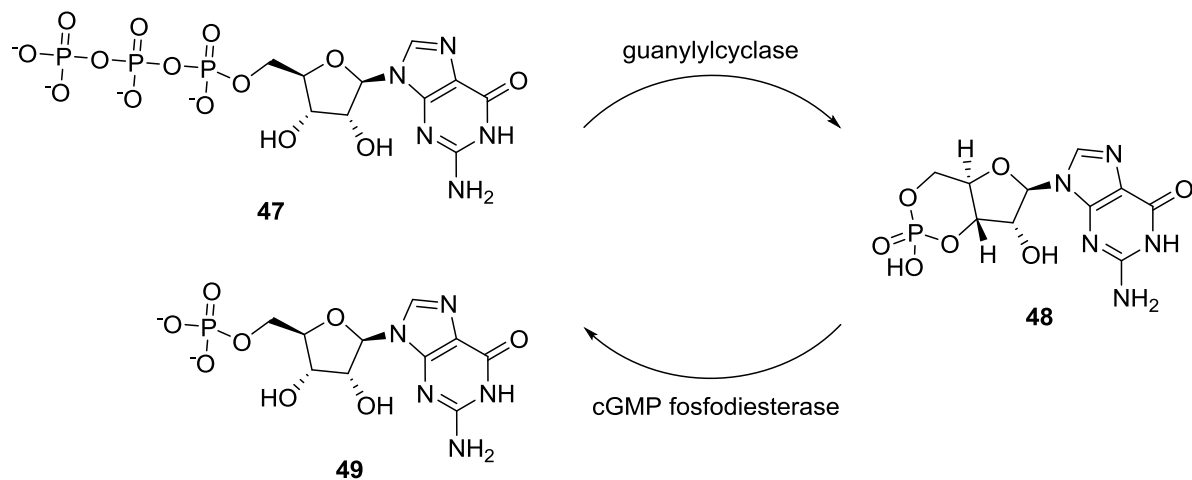
L-diproline 1 zou gesynthetiseerd kunnen worden met NRPS's of CDPS's. Vermeende NRPS-homologen worden tot expressie gebracht in het transcriptoom van *S. robusta*. Verwacht wordt dat, als NRPS's een rol spelen bij de biologische synthese van L-diproline, deze homologen onder invloed van SIP⁺ zouden stijgen in concentratie. Dit is echter niet het geval, wat niet wil zeggen dat de synthese niet met NRPS's kan plaatsvinden. Er werden nog geen CDPS-homologen in *S. robusta* geïdentificeerd, maar dit wil niet zeggen dat de L-diprolinesynthese niet op basis van CDPS's kan verlopen.²³

Voor CDPS's en NRPS's werd dus geen sterk verschil waargenomen tussen de behandelde en onbehandelde cultuur. Echter, voor één transcript werd een stijgende expressie doorheen de tijd waargenomen, namelijk voor een bifunctioneel esterase dat bestaat uit een adenylaat/guanylaatcyclase (AC/GC) en een cyclisch nucleotide fosfodiesterase (PDE). Dit bifunctionele enzym staat in voor respectievelijk de synthese en de afbraak van een cyclisch nucleotide, 3',5'-cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP) in het geval van AC en 3',5'-cyclisch guanosinemonofosfaat (cGMP) in het geval van GC.^{23,76,79} De combinatie van AC met PDE werd waargenomen in het levermos *Marchantia polymorpha*, waarbij AC zorgt voor de synthese van cAMP en PDE voor de afbraak ervan.⁸⁰

Liu et al. hebben verschillende AC's en GC's geanalyseerd om hun katalytisch mechanisme te modelleren.⁷⁹ Door het vergelijken van de geconserveerde residuen in het katalytisch centrum van het cyclase van *S. robusta* kon besloten worden dat GC, en niet AC, deel uitmaakt van het bifunctioneel enzym. Op twee residuen na, zijn alle guaninebindingsresiduen in het GC van *S. robusta* geconserveerd en, behalve voor de pyrofosfaatbindingsplaats, zijn alle katalytische residuen geconserveerd.^{23,76} Bovendien zijn acht aminozuren die geconserveerd zijn in cAMP

PDE's, maar niet in cGMP PDE's, niet geconserveerd in het PDE van *S. robusta*.⁸¹ Hieruit kan besloten worden dat bij *S. robusta* een GC/PDE voorkomt.^{23,76}

GC's zetten guanosinetrifosfaat (GTP) **47** om naar cGMP **48** en pyrofosfaat (Schema 7). De divalente metaalcofactor onder biologische omstandigheden is Mg^{2+} .^{23,82} Fosfodiesterasen zijn cyclische nucleotideafbraakenzymen, aangezien ze cyclisch GMP **48** hydrolyseren naar niet-cyclisch GMP **49**.^{83,84}



Schema 7: Overzicht van de opbouw van cGMP door guanylaatcyclase en de afbraak ervan door fosfodiesterase (gebaseerd op ⁸⁴)

cGMP wordt geproduceerd door zowel prokaryoten als eukaryoten en is van belang bij bijvoorbeeld proteïnekinase-activiteit en cGMP-geleide ionenkanalen, wat wil zeggen dat het een invloed heeft op cellulaire effecten.⁸³ In planten speelt cGMP een rol bij het verdedigingsmechanisme na een aanval van pathogenen en bij het sluiten van stomata in het geval van osmotische stress.⁸³

GC's kunnen voorkomen in twee vormen: membraangebonden en in opgeloste vorm. Activatoren voor deze enzymen zijn stikstofoxide (NO), natriuretische proteïnen, guanylinen, uroguanylinen en guanylylcyclase activerende proteïnen.⁸² Membraangebonden enzymen zijn gelijkend qua structuur op enzymen die voorkomen in het cytosol en dus oplosbaar zijn, maar membraangebonden GC's worden niet gestimuleerd door NO.⁸² In *S. robusta* komt het bifunctioneel enzym transmembraan voor met het katalytische centrum binnenin de cel en een ligand-bindingsdomein langs de buitenkant van de cel. Vermoedelijk wordt het enzym geactiveerd door een ligand dat bindt aan het extracellulaire membraan. Dit ligand zou mogelijk SIP^+ kunnen zijn. Hieruit kan dus afgeleid worden dat het bifunctioneel enzym een rol zou kunnen spelen in het feromoonmechanisme, al is de functie van cGMP in *S. robusta* nog onbekend. Vermoed wordt dat de synthese van cGMP een reeks aan signalen activeert, wat leidt tot *cell cycle arrest* en *L-dipropine* productie.^{23,76}

2.4 Besluit

In deze literatuurstudie werd de veelzijdigheid van diketopiperazinen aangetoond. DKPen komen wijdverspreid voor in de natuur en zijn terug te vinden bij bacteriën, fungi, planten en dieren. Door hun structuur en chemische en enzymatische stabiliteit spelen ze een belangrijke rol in het geneesmiddelenonderzoek. Talrijke DKPen met een structuur die gelijkend is aan *L*-diproline **1** werden in de natuur geïdentificeerd.

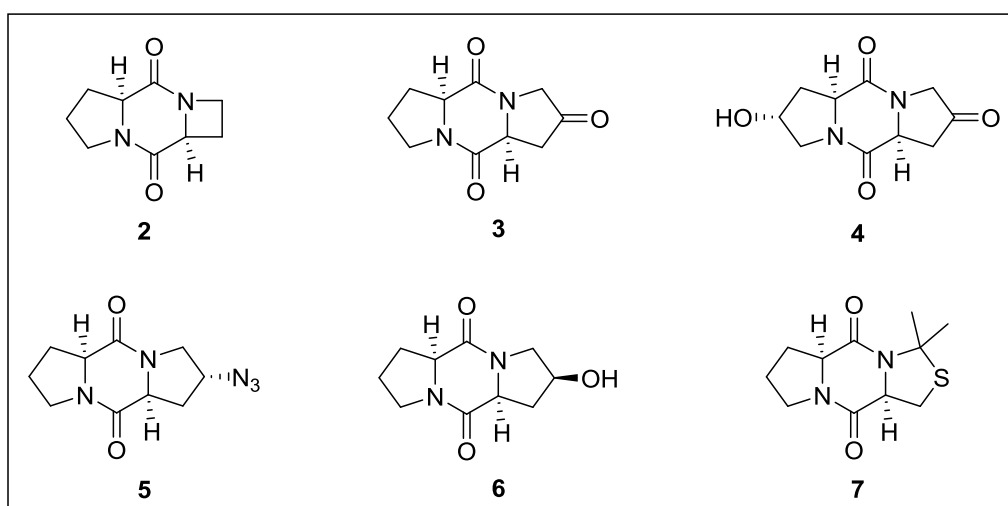
Twee routes voor de biosynthese van CDPen zijn gekend: cyclodipeptidesynthases en niet-ribosomale peptidesynthetases. In verschillende CDP-synthetiserende organismen is de biosynthetische route geïdentificeerd, maar in *Seminavis robusta* is het nog onduidelijk hoe *L*-diproline **1** wordt gesynthetiseerd.

De synthese van *L*-proline **46** in *S. robusta* is wel opgehelderd en start vanuit *L*-glutamaat met behulp van de enzymen Δ 1-pyrroline-5-carboxylaatsynthetase en Δ 1-pyrroline-5-carboxylaatreductase. De verdere synthese tot *L*-diproline **1** is nog niet gekend, maar vermoedelijk speelt het bifunctioneel esterase guanylaatcyclase/cGMP fosfodiesterase hierbij een rol. Verder onderzoek naar de biosynthese is noodzakelijk om de rol van dit bifunctioneel enzym te verklaren.

Hoofdstuk 3

Bespreking van de resultaten

Gillard *et al.* hebben aangetoond dat de molecule *L*-diproline fungeert als feromoon voor de seksuele voortplanting van *S. robusta*.²¹ Uit Hoofdstuk 1 bleek dat er nog weinig gekend is over de structuur van de receptor waarop het feromoon inwerkt en uit Hoofdstuk 2 bleek het enzym dat verantwoordelijk is voor de synthese van het feromoon, ook onbekend. Door het uitvoeren van structuur-activiteitsrelatie(SAR)-studies wordt getracht meer informatie te verkrijgen omtrent de receptor van het feromoon. Aan de hand van de structuur van *L*-diproline werden zes analogen (Figuur 6) geselecteerd om de SAR in biologische testen te onderzoeken. In dit hoofdstuk worden eerst de syntheses van de bouwstenen die nodig zijn voor de synthese van de *L*-diproline-analogen besproken en vervolgens wordt dieper ingegaan op de synthese van de analogen zelf. Ten slotte worden de resultaten van de biologische testen weergegeven en besproken.



Figuur 6: Gewenste *L*-diproline-analogen

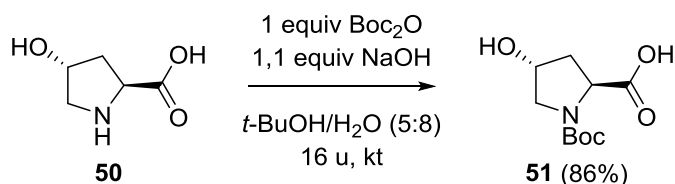
3.1 Synthese van de *L*-proline-analogen

De synthese van de *L*-diproline-analogen is gebaseerd op de koppeling van twee *L*-proline-analogen waarvan één analoog voorkomt als methylester en bij het andere de amine-functionaliteit beschermd is met een Boc-groep. De synthese van deze bouwstenen wordt in dit eerste deel besproken.

3.1.1 Synthese van *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline 54

Voor de synthese van *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** werd gestart van *trans*-4-hydroxy-*L*-proline **50**. Aangezien het noodzakelijk is om eventuele nevenreacties met het stikstofatoom van de

aminefunctie te voorkomen, werd een *tert*-butyloxycarbonyl(Boc)-beschermende groep geïntroduceerd, gebruikmakend van di(*tert*-butyl)dicarbonaat (Boc_2O) in de aanwezigheid van een base. Het vrije elektronenpaar van stikstof zal een nucleofiele aanval uitvoeren op een carbonylgroep van Boc_2O , met vrijstelling van CO_2 en *tert*-butanol en aanhechting van een Boc-groep. De bescherming van een aminenfunctionaliteit met een Boc-groep wordt vaak toegepast in de peptidesynthese, aangezien deze Boc-groep inert is ten opzichte van tal van nucleofiele reagentia en stabiel is in basische omstandigheden.⁸⁵ In deze synthese werd Boc_2O gecombineerd met NaOH in *tert*-butanol (Schema 8).⁸⁶ Aangezien dit een visceus product opleverde, werd getracht om dit te kristalliseren met behulp van hexaan. Het product **51** werd opgelost in verwarmd EtOAc en hieraan werd hexaan traag toegedruppeld in een eerste tijdspanne van 30 minuten waarna geroerd werd gedurende één uur, en vervolgens in een tweede tijdspanne van 60 minuten waarna geroerd werd gedurende twee uur.⁸⁷ Er moet opgemerkt worden dat bij de start het product niet oploste in EtOAc. Na het indampen van het solvent, resulteerde dit in een wit schuim dat tot een poeder kon geklopt worden. Echter, bij te lange blootstelling aan de atmosfeer werden de kristallen weer kleverig. Zowel *L*-proline als 4-hydroxy-*L*-proline worden in de literatuur beschreven als hygroscopische verbindingen, wat deze observatie verklaart.^{88,89} Aangezien de kristallisatie niet mogelijk bleek, werd verder gewerkt met het product dat voor kristallisatie bekomen werd.

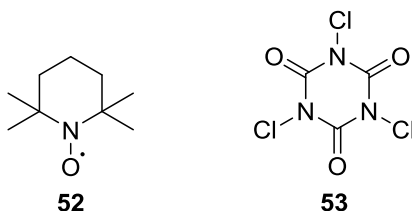


Schema 8: Synthese van *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline

Het Boc-beschermd aminozuur **51** komt voor als twee rotameren en deze zijn gemakkelijk herkenbaar op ^1H NMR als een kleiner en een groter signaal rond δ 1,45 ppm in CDCl_3 . Door de sterische hinder bij de rotatie rond de C-N-binding komt de Boc-groep niet even vaak in de *cis*- als in de *trans*-conformatie voor. In de literatuur wordt beschreven dat de *trans*-conformatie stabiel is doordat de *tert*-butylgroep verder weg staat van de carbonzure groep en er zo geen significante interacties kunnen ontstaan tussen beide.⁹⁰ Over het algemeen komt bij Boc-beschermd aminozuren de *cis*-conformatie in een kleine fractie voor (2%), maar op basis van studies van de dihedrale hoek en de daarbij horende energie van *L*-proline, bleek dat bij dit aminozuur de *cis*-conformatie in de helft van de gevallen voorkomt.⁹⁰

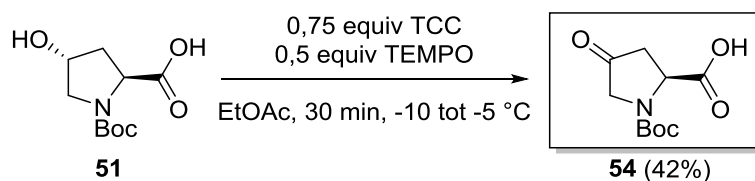
Vervolgens werd de hydroxylgroep van **51** geoxideerd tot een ketofunctie in derivaat **54**, wat in de literatuur op verschillende manieren beschreven wordt. In vorig experimenteel onderzoek werd de oxidatie uitgevoerd met een Jones reagens, een oplossing van chromiumtrioxide Cr(VI)O_3 en verdund zwavelzuur, maar dit resulteerde in een beperkt rendement.⁹¹ Bovendien is chroom(VI) kankerverwekkend. Een 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy (TEMPO)-gekatalyseerde oxidatie met trichloorisocyanuurzuur (TCC) werd in deze masterthesis als alternatief bestudeerd.

In deze methode werden 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy **52** (TEMPO) en trichloorisocyanuurzuur **53** (TCC) gecombineerd. Deze methode werd in de literatuur beschreven met 0,75 equivalenten TCC en 0,5 equivalenten TEMPO in droge EtOAc bij 25 tot 30°C, wat slaagde op kleine schaal (1 g), maar op grote schaal (8 g) werd het gewenste product niet gevormd.⁸⁷ Op kleine schaal bedroeg het rendement vóór en na omkristallisatie respectievelijk 37% en 14%.



In de literatuur wordt beschreven dat de omzetting van secundaire alcoholen naar ketonen beperkt is en veel langer duurt, dan bij primaire alcoholen het geval is.⁹² Dit zou een mogelijke verklaring voor het lage rendement kunnen geven, aangezien de alcoholfunctie sterisch gehinderd wordt door de *L*-prolinering. Anderzijds zouden ook variaties in de pH een mogelijke reden kunnen zijn voor het lage rendement. Als de pH te hoog is, bevindt het zuur zich in de zoutvorm waardoor het tijdens de opwerking naar de waterfase overgaat, wat resulteert in rendementsverlies. Bij een te lage pH zou de Boc-beschermende groep afgesplitst kunnen. Bovendien is het mogelijk dat de synthese die beschreven werd in de literatuur bij een te hoge temperatuur plaatsvond en daarbij de reactietijd te lang was.

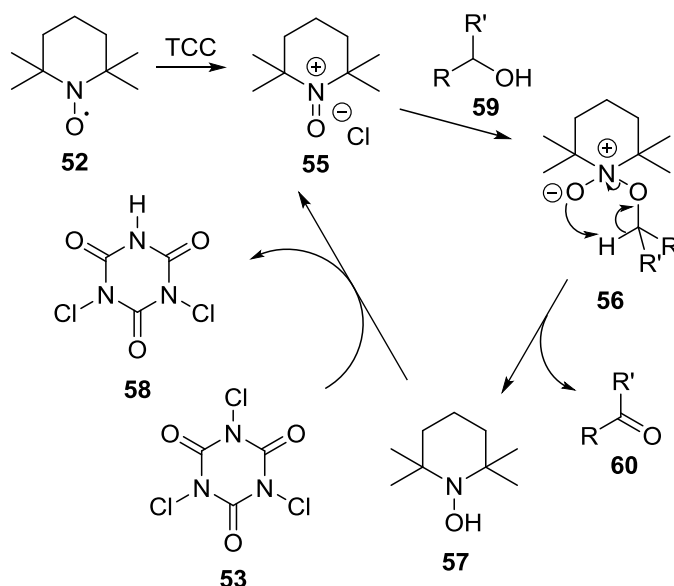
Daarom werd in een volgende poging de reactie uitgevoerd bij -10 tot -5 °C gedurende 30 minuten (Schema 9). De pH werd opgevolgd en bleef constant op 5. In de literatuur werd de reactie gequencht met water, maar om de vorming van HCl en bijgevolg de afsplitsing van de Boc-groep te voorkomen, werd hier gequencht met natriumbicarbonaat. Na de filtratie over een celietfilter werd een javelgeur waargenomen door de vorming van HOCl, dat ontstaat door reactie van TCC met water uit de natriumbicarbonaatoplossing. Na indampen van EtOAc en HOCl en heroplossen in EtOAc werden twee fasen (H₂O en EtOAc) bekomen waarbij het product zich in de organische fase bevond. Na extractie met EtOAc, wassen met pekkel, drogen met MgSO₄, filtratie en indampen van het solvent, werd het gewenste product **54** bekomen dat uitkristalliseerde na toevoegen van EtOAc en hexaan. Dit werd opgezuiverd via een omkristallisatie in EtOAc en leverde donkergrijze kristallen op met een rendement van 42%.



Schema 9: Synthese van *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline

Door de felle oranje kleur van de katalysator TEMPO kleurden het reactiemengsel en de daaruit verkregen kristallen oranje. Wanneer het solvent toegevoegd werd bij de omkristallisatie, kleurde dit zwart en de kristallen die bekomen werden hadden dezelfde donkere kleur. Bij alle verdere reacties met **54** bleef deze oranje kleur achter, ook al werden op ^1H NMR geen signalen van TEMPO waargenomen.

Het voordeel van deze oxidatiemethode is dat milde condities kunnen aangehouden worden en dat er geen transitie-metalen nodig zijn om de oxidatie mogelijk te maken. Bovendien verloopt de reactie bij lage temperatuur en gebeurt ze snel en efficiënt. Zoals eerder vermeld, werd er in deze reactie een katalysator gebruikt. TCC **53** moet reageren met een katalytische hoeveelheid TEMPO **52** zodat het *N*-oxoammoniumion **55** gevormd kan worden (Schema 10). Dit zal op zijn beurt de hydroxylgroep van **59** oxideren tot een keton in **60** en leidt tot de vorming van hydroxylamine **57**, dat opnieuw moet geoxideerd worden tot het *N*-oxoammoniumion **55** door TCC **53**. Door de aanwezigheid van water zal hydrolyse van TCC plaatsvinden en tot de vorming van HOCl leiden, wat eigenlijk verantwoordelijk is voor de oxidatie van TEMPO **52**.⁹³

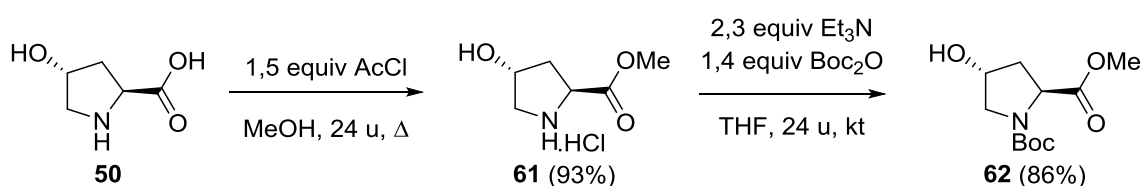


Schema 10: Katalytisch mechanisme van TEMPO

3.1.2 Synthese van *trans*-4-azido-*L*-proline methylester.HCl **66**

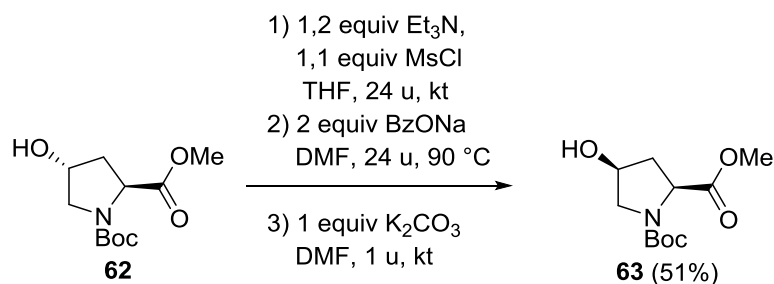
De synthese van *trans*-4-azido-*L*-proline methylester.HCl **66** start vanuit *trans*-4-hydroxy-*L*-proline **50**. Het carbonzuur **50** werd veresterd tot methylester **61** met behulp van een Fisherverestering (Schema 11). Bij dit type verestering wordt een carbonzuur met een alcohol omgezet tot een ester in aanwezigheid van een sterk zuur.⁹⁴ In de uitgevoerde synthese werd MeOH als alcohol aangewend om het methylester te vormen en werd het sterk zuur HCl gevormd door reactie van MeOH met AcCl.⁹⁵ Dit werd gedurende 24 uur geroerd onder reflux in droge omstandigheden. Na het toevoegen van het reactiemengsel aan ether sloeg het product neer en na filtratie werden witte kristallen bekomen met een rendement van 93%.

De Boc-bescherming van de aminefunctie van **61** werd in een eerste poging uitgevoerd zoals beschreven bij de synthese van **51** (Schema 8). Door de aanwezigheid van water in het reactiemengsel vond echter hydrolyse plaats, waardoor de esterfunctie verloren ging en het carbonzuur *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline **51** gevormd werd. Omwille hiervan werd overgeschakeld op een andere methode, waarin water vermeden werd. Als base werd Et₃N gebruikt, nog altijd in combinatie met Boc₂O (Schema 11). De synthese werd uitgevoerd door enerzijds verbinding **61** op te lossen in Et₃N en droge THF en anderzijds Boc₂O op te lossen in droge THF. Door het toevoegen van de laatstgenoemde oplossing aan de hydroxyprolineoplossing werd een wit reactiemengsel gevormd. Na afloop van de reactie en na opwerking werd een lichtgele olie bekomen. Het product **62** werd verder opgezuiverd met kolomchromatografie om de resterende hoeveelheid Boc₂O te verwijderen.⁹⁶



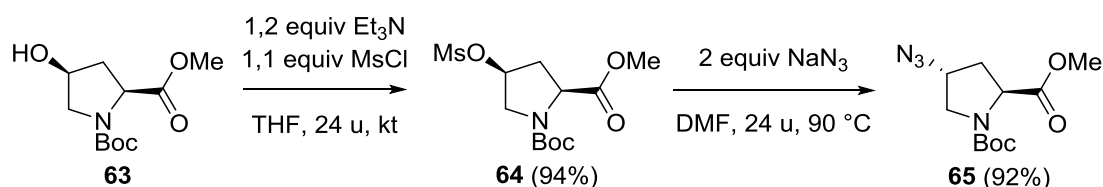
Schema 11: Synthese van *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester

Vervolgens werd een Waldeninversie uitgevoerd om de stereochemie van *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **62** om te keren naar de *cis*-stereochemie in **63**, wat resulteerde in inversie van het chirale centrum (Schema 12). Dit gebeurde in drie stappen waarbij elke stap resulteerde in een lichtbruine olie die spontaan uitkristalliseerde. De rendementen van deze drie stappen waren respectievelijk 82%, 91% en 68%. Na de laatste stap werd het product opgezuiverd met kolomchromatografie.⁹⁷

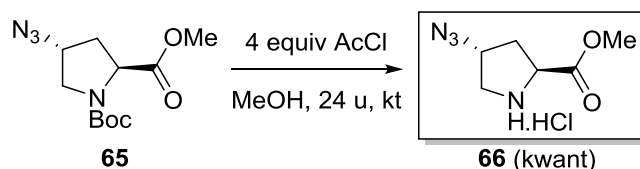


Schema 12: Waldeninversie van *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester tot *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester

Om ten slotte *N*-Boc-*trans*-4-azido-*L*-proline methylester **65** te vormen, werd de hydroxylgroep van **63** omgezet naar een goede *leaving* groep (**64**), zodat een azide-ion vervolgens een nucleofiele substitutie kon uitvoeren (Schema 13). Eerst werd *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **63** opgelost in droge THF waaraan Et₃N en MsCl worden toegevoegd. Na de opwerking resulteerde dit in een lichtgele olie die gedeeltelijk uitkristalliseerde. Daarna werd verbinding **64** opgelost in DMF en hieraan werden twee equivalenten NaN₃ toegevoegd. Na opwerking resulteerde dit in *N*-Boc-*trans*-4-azido-*L*-proline methylester **65**, een laag-visceuze lichtbruine olie.⁹⁷

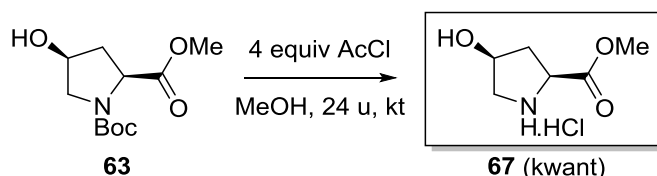

 Schema 13: Synthese van *N*-Boc-*trans*-4-azido-proline methylester

Ten slotte vond een Boc-ontscherming plaats in zuur milieu, door de combinatie van AcCl en MeOH om het gewenste product **66** te vormen (Schema 14). Aangezien de vorming van HCl exotherm is, werd methanol gekoeld in een ijsbad voordat AcCl hieraan werd toegedruppeld. Na afloop van de reactie was enkel verdamping van het solvent noodzakelijk, wat resulteerde in een lichtbruine olie. Mogelijk is onvolledige verdamping van het solvent de reden voor het kwantitatief rendement. Ook in de literatuur worden vaak kwantitatieve rendementen voor de Boc-ontscherming gerapporteerd.⁹⁸


 Schema 14: Synthese van *trans*-4-azido-*L*-proline methylester.HCl

3.1.3 Synthese van *cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester.HCl **67**

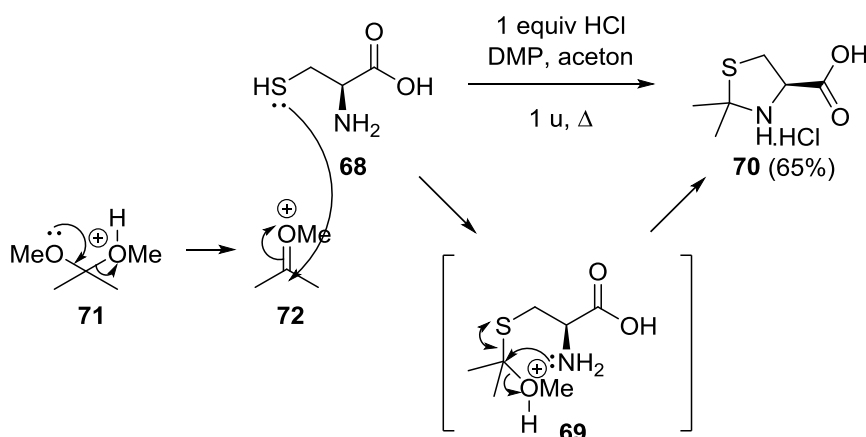
Een volgende bouwsteen die nodig was voor de synthese van de *L*-diproline-analogen kon gesynthetiseerd worden door Boc-ontscherming van een intermediair van de *trans*-4-azido-*L*-proline methylester.HCl-synthese (Sectie 3.1.2), namelijk *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **63**. Net zoals bij de Boc-ontscherming van **65** het geval was (Schema 14), kon ook hier de combinatie van AcCl en MeOH gebruikt worden om de Boc-ontscherming van **63** te bewerkstelligen met vorming van **67** (Schema 15). Dit leverde witte kristallen op.


 Schema 15: Synthese van *cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester.HCl

3.1.4 Synthese van *L*-methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat **76**

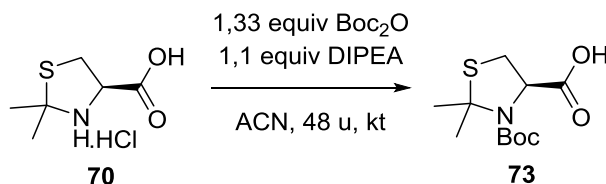
De synthese van *L*-methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat **76** vertrok vanuit *L*-cysteïne **68** en werd volgens verschillende methoden uitgevoerd. In een eerste poging werd getracht om *L*-cysteïne **68** eerst te cycliseren in HCl, 2,2-dimethoxypropan en aceton. *Lewis et al.* startten de synthese vanuit *L*-cysteïne hydrochloridemonohydraat, waardoor hier in eerste instantie 1

equivalent HCl en 1 equivalent H₂O werden toegevoegd aan *L*-cysteïne **68**.⁹⁹ Dit resulteerde echter niet in productvorming door hydrolyse van **72**. HCl is commercieel beschikbaar als een 12 M oplossing en hiermee werd in de eerste poging geen rekening gehouden. Vervolgens werd enkel nog met 1 equivalent HCl gewerkt, wat wel tot productvorming leidde. Witte kristallen werden gevormd en werden in twee worpen afgefiltreerd. Tijdens de reactie werd per molecule *L*-cysteïne één molecule 2,2-dimethoxypropan **71** geïncorporeerd in de structuur (Schema 16). Dit gebeurt door een nucleofiele additie van zwavel aan verbinding **72** wat leidt tot de vorming van intermediair **69**, waarna stikstof door een nucleofiele additie ringsluiting induceert (**70**).



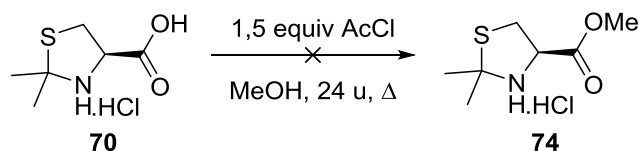
Schema 16: Synthese van het HCl zout van *L*-2,2-dimethylthiazolidine-4-carbonzuur

Aangezien voor de vorming van de *L*-diproline-analogen het *L*-proline-analoog ofwel *N*-Boc-beschermd moet zijn ofwel moet voorkomen als methylester, werden beide omzettingen van **70** getest. In de eerste methode werd Boc₂O gebruikt in de aanwezigheid van DIPEA en productvorming werd opgevolgd via LC-MS (Schema 17). Na de opwerking moest het product **73** uitgekristalliseerd worden met *n*-hexaan, maar er werden geen kristallen gevormd. Omwille van onzuiverheden werd het product opgezuiverd met kolomchromatografie. Aangezien dit slechts enkele milligram product opleverde en omwille van de omslachtigheid bij de opwerking, werd overgeschakeld op een andere methode.



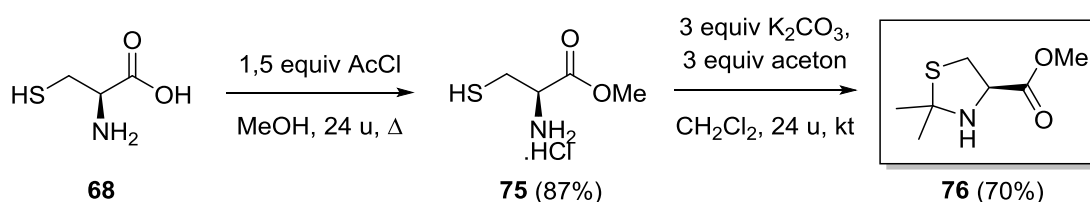
Schema 17: Synthese van *N*-Boc-*L*-2,2-dimethylthiazolidine-4-carbonzuur

In de tweede methode werd de omzetting van het HCl zout van *L*-2,2-dimethylthiazolidine-4-carbonzuur **70** tot het methylester **74** op dezelfde manier uitgevoerd zoals bij de verestering van verbinding **50** (Schema 11). Wanneer de reactie werd opgevolgd via LC-MS (Schema 18), werd geen productvorming waargenomen, bijgevolg werd overgegaan op een andere werkwijze.



Schema 18: Poging tot synthese van *L*-methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat.HCl

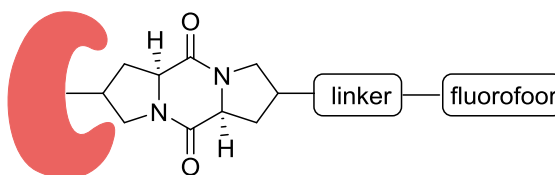
In plaats van *L*-cysteïne **68** eerst te cycliseren en dan om te zetten naar het methylester, werd geprobeerd om het eerst om te zetten naar *L*-cysteïne methylester.HCl **75** en vervolgens te cycliseren, wat wel positieve resultaten opleverde (Schema 19).^{100,101} De omzetting van *L*-cysteïne **68** naar het methylester **75** werd uitgevoerd op dezelfde manier zoals bij verbinding **50** en leverde witte kristallen op. Vervolgens vond de ringsluiting plaats tot **76** met behulp van aceton in CH₂Cl₂ en dit resulteerde in een gele laag-visceuze olie.



Schema 19: Synthese van *L*-methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat

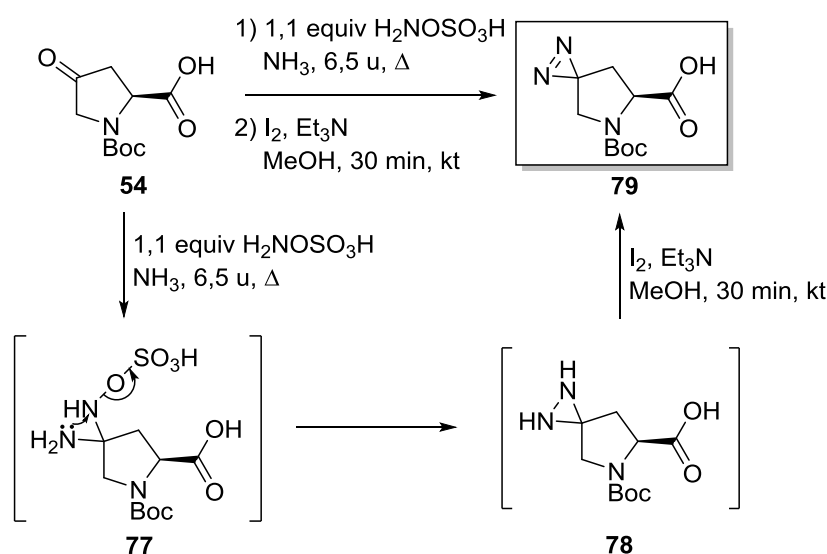
3.1.5 Synthese van *N*-Boc-foto-*L*-proline **79**

Naast de eerder besproken *L*-diproline-analogen die getest zullen worden op hun SAR in biologische testen, is er ook interesse in het ontwikkelen van een *L*-diproline-analoog dat kan binden met de proteïnen van de cellen (Figuur 7). Dit kan dienst doen als een probe om de feromoonreceptor te identificeren. Daarvoor moet op *L*-diproline een groep geïntroduceerd worden voor *photoaffinity labeling* (PAL), dit is een groep die onder irradiatie met UV aan proteïnen kan binden. Hiervoor werd gekozen voor een diazirine dat gekoppeld wordt aan een *L*-proline molecule, foto-*L*-proline **79** genoemd. Dit analoog wordt vervolgens gekoppeld met een ander *L*-proline-analoog met vorming van een *L*-diproline-analoog. Door de aanwezigheid van een diazirine-eenheid wordt, na fotolyse, een reactief carbeen gevormd. Dit carbeen kan reageren met de aminozuursequentie van een proteïne en een covalente binding vormen. Dit carbeen zal met bijna elk extracellulair eiwit kunnen binden en afhankelijk van het *L*-diproline-analoog al dan niet met de feromoonreceptor. Op die manier kan het verschil tussen een bindend en niet-bindend analoog onderzocht worden met massaspectrometrie *proteomics* om zo de feromoonreceptor te identificeren. Indien visualisatie gewenst is, kan een fluorofoor aangehecht worden met een azide als *linker*, waarbij men spreekt van klikchemie.¹⁰²⁻¹⁰⁴



Figuur 7: *L*-dipropylamine-analoog dat kan gebruikt worden als een probe voor de identificatie van de feromoonreceptor

In deze masterthesis werd de synthese van *N*-Boc-foto-*L*-proline **79** uitgevoerd, maar werd geen verder onderzoek verricht naar de ontwikkeling van de probe. De synthese startte vanuit *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** (Schema 20). In de eerste stap werd door het toevoegen van een overmaat NH_3 en $\text{H}_2\text{NOSO}_3\text{H}$ diaziridine **78** gevormd. In de tweede stap vond een oxidatie plaats van het diaziridine **78** tot het diazirine **79** met I_2 in MeOH.¹⁰⁵



Schema 20: Synthese van *N*-Boc-foto-*L*-proline

Aangezien NH_3 bij kamertemperatuur gasvormig is, werd een opstelling met een koude vinger condensor opgezet om NH_3 te condenseren. De condensor werd gevuld met droog ijs en *i*PrOH en werd verbonden met een 2-nek kolf die zich in een bad van droog ijs en *i*PrOH bevond. Vervolgens werd NH_3 gedroogd met natrium en benzofenon, vooraleer het werd overgebracht in de kolf die *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** bevatte. Hieraan werden 1,1 equivalenten hydroxylamine-*O*-sulfonzuur toegevoegd wat leidde tot de vorming van diaziridine **78** (Schema 20).

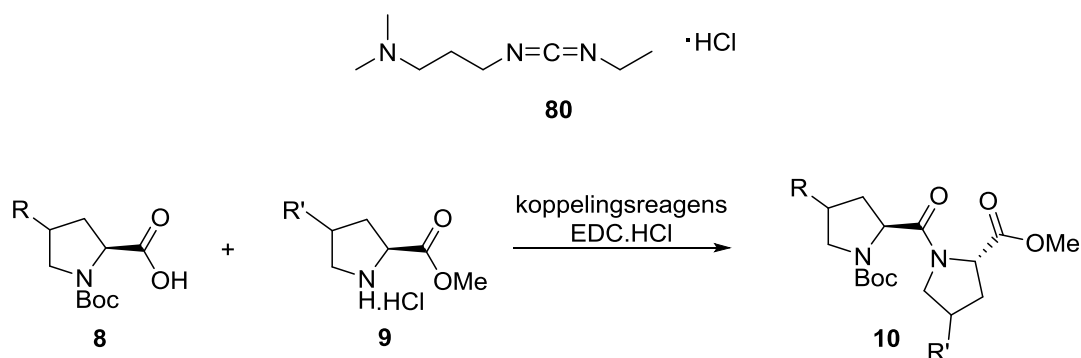
Voor de oxidatie van het diaziridine **78** naar het diazirine **79** werd getitreerd met een 0,1 M joodoplossing in MeOH. Hiervoor mocht er echter geen NH_3 meer aanwezig zijn, aangezien anders het explosieve NI_3 zou kunnen gevormd worden. NH_3 kon deels verdampt worden uit de reactie, maar een deel bleef aanwezig als een zout met *N*-Boc-diaziridine-*L*-proline **78**. Door het toevoegen van Et_3N kon NH_3 in het zout vervangen worden door Et_3N waardoor de resterende NH_3 vrijkwam, ingedampt kon worden en op die manier geen gevaar meer vormde.

Na de opwerking werd het product *N*-Boc-foto-*L*-proline **79** bekomen, maar ook ongereageerd *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** was nog aanwezig. Er werd getracht om dit op te zuiveren via *reversed phase* automatische kolomchromatografie. Een eerste poging (H₂O/ACN 90/10-10/90) resulteerde in gelijktijdige eluering van start- en eindproduct. In een tweede poging werd gestart met slechts 5% ACN om zo een betere scheiding te verkrijgen, maar ook bij deze gradiënt bleek de scheiding niet mogelijk. Bovendien was er een vervuiling op de kolom aanwezig die meegeëluëerd was en een product opleverde dat nog onmogelijk op te zuiveren was. De synthese werd, wegens tijdsgebrek, niet herhaald.

3.2 Synthese van de *L*-diproline-analogen

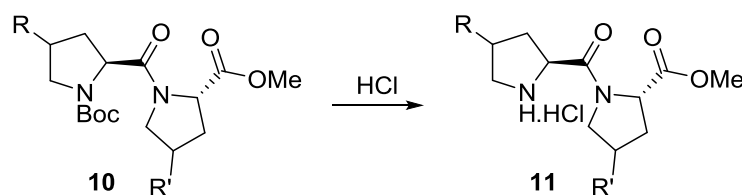
3.2.1 Algemene procedure voor de synthese van de *L*-diproline-analogen

De *L*-proline-analogen werden vervolgens gebruikt voor de synthese van de *L*-diproline-analogen. Deze werden gesynthetiseerd volgens een algemene strategie die in drie stappen verloopt.³² Eerst worden twee *L*-proline-analogen gekoppeld met behulp van het koppelingsreagens *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl) **80** (Schema 21). Dit koppelingsreagens zorgt voor de activatie van de carboxylgroep van **8** zodat een amidebinding tussen de twee *L*-proline-analogen kan gevormd worden. Daarvoor is het van belang dat bij het ene *L*-proline-analoog de stikstofgroep beschermd is (**8**), en dat bij het andere het carbonzuur omgezet is tot een ester (**9**), zodat EDC.HCl slechts één *L*-proline-analoog kan activeren. Op die manier worden de *L*-proline-analogen telkens op dezelfde manier met elkaar gekoppeld. Hierbij wordt een ureïde als bijproduct gevormd.



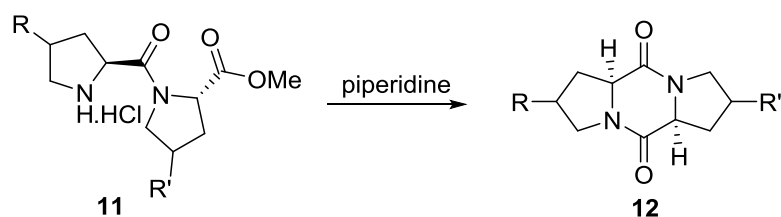
Schema 21: Stap 1: koppeling van twee *L*-proline-analogen

In de volgende stap zal onder zure omstandigheden de beschermende Boc-groep afgesplitst worden met vorming van verbinding **11** (Schema 22). Dit gebeurt in zuur milieu zoals vermeld bij Sectie 3.1.2 (Schema 14).



Schema 22: Stap 2: *N*-Boc-ontscherming van het koppelingsproduct

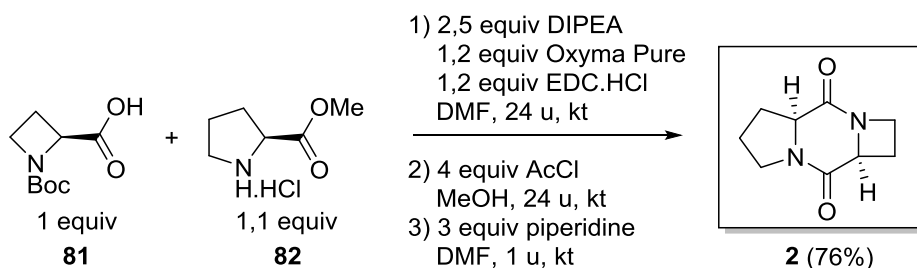
Ten slotte vindt de ringsluiting plaats met behulp van een base (Schema 23). Piperidine zal zorgen voor de activatie van het stikstofatoom van **11** zodat stikstof een nucleofiele additie kan uitvoeren op de carbonylgroep. Dit resulteert in de vorming van het *L*-diproline-analoog **12**.



Schema 23: Stap 3: ringsluiting van het koppelingsproduct

3.2.2 Koppeling van *N*-Boc-*L*-azetidine-2-carbonzuur **81** en *L*-proline methylester.HCl **82**

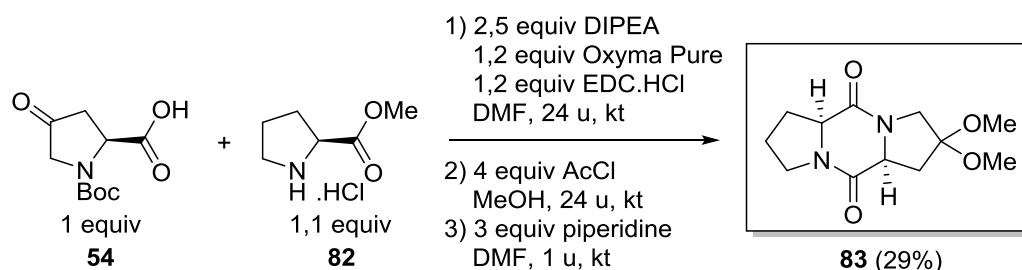
Het eerste analoog dat gesynthetiseerd werd, werd verkregen door de koppeling van azetidine **81** en proline **82**, die beide commercieel beschikbaar zijn (Schema 24). De synthese werd uitgevoerd volgens de bovenvermelde methode. Uit vorig experimenteel onderzoek bleek dat hogere rendementen verkregen werden wanneer met 1 equivalent van het Boc-beschemde *L*-proline-analoog en 1,1 equivalenten van het methylester gewerkt werd.⁹¹ Bij de koppelingsstap werd naast EDC.HCl, ook Oxyma Pure toegevoegd om eventuele racemisatie in alkalisch milieu tegen te gaan. Hiernaast werd ook DIPEA toegevoegd, een tertiair amine dat gebruikt werd als base. Na de eerste stap was het nodig om het tussenproduct op te zuiveren via kolomchromatografie om het ureïde-bijproduct te verwijderen. Na de Boc-ontscherming werd een gele, deels uitgekristalliseerde olie bekomen. Ten slotte vond de ringsluiting plaats, waarna het product opgezuiverd werd om de resterende hoeveelheid piperidine te verwijderen. Dit gebeurde met kolomchromatografie en leverde uiteindelijk witte kristallen op (**2**).



Schema 24: Synthese van cyclo(*L*-Aze-*L*-Pro)

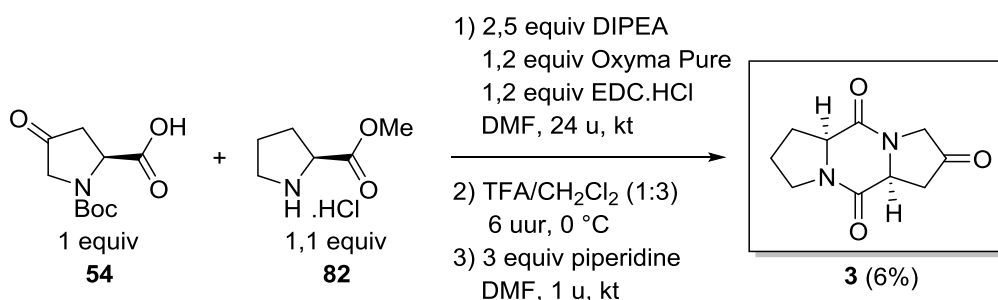
3.2.3 Koppeling van *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** en *L*-proline methylester.HCl **82**

In een eerste stap werden *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** en *L*-proline methylester.HCl **82** gekoppeld met behulp van EDC.HCl (Schema 25). Het gekoppelde product werd opgezuiverd met kolomchromatografie. Vervolgens werd de Boc-ontscherming onder zure omstandigheden uitgevoerd. Echter, wanneer dit werd opgevolgd via LC-MS was er geen vorming van het Boc-ontschermde product zichtbaar en was het niet duidelijk welk product wel gevormd werd. Om dit te achterhalen, werd de derde stap van de synthese uitgevoerd. Door het opnemen van ^1H NMR en ^{13}C NMR spectra van het gevormde product na de derde stap, werd het duidelijk dat het keton was omgezet in een dimethylacetaal in **83**. Op het ^1H NMR spectrum werd een signaal waargenomen dat integreerde voor 6 protonen bij δ 3,29 ppm en op het ^{13}C NMR spectrum kon een koolstofsignaal bij δ 106,2 ppm teruggevonden worden. Zo konden ook de massa's op LC-MS verklaard worden, terwijl dat oorspronkelijk niet het geval was. Door fragmentatie is namelijk niet het moederion, maar wel het moederion zonder methoxygroep zichtbaar. Het product werd opgezuiverd met kolomchromatografie en leverde een donkerbruine olie op. Er werd besloten om dit product ook te gebruiken in de biotesten.



Schema 25: Synthèse van dimethoxy-*L*-diproline

Aangezien het niet mogelijk bleek om de Boc-ontscherming met AcCl en MeOH uit te voeren, werd in een tweede poging met trifluorazijnzuur (TFA) gewerkt (Schema 26). Dit leverde wel goede resultaten op. In de derde stap werd de ringsluiting opnieuw uitgevoerd met piperidine, maar bij opvolging op LC-MS kon slechts een heel beperkte hoeveelheid productvorming worden waargenomen. Bij de opname van een ^1H NMR-spectrum waren er dan ook, behalve de signalen van piperidine, nauwelijks productsignalen zichtbaar. Er werd getracht om dit product op te zuiveren met kolomchromatografie en dit leverde uiteindelijk toch 58 mg product **3** op. Dit lage rendement kan toegeschreven worden aan de instabiliteit van het gevormde aminoketonintermediair.¹⁰⁶

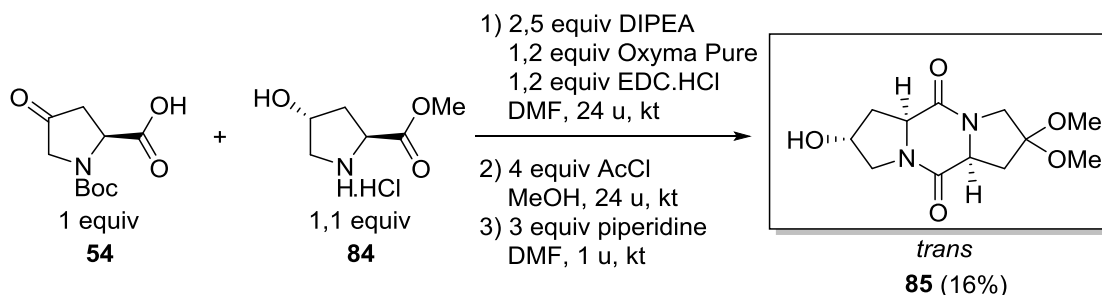


Schema 26: Synthese van oxo-L-diproline

Aangezien een acetaal in een waterig zuur kan omgezet worden naar een keton, werd getracht om dimethylacetaal **83** om te zetten naar keton **3**. Bij het opvolgen van deze reactie met LC-MS bleek de omzetting door te gaan, maar een volledige omzetting werd niet bereikt, zelfs niet na vier dagen reactietijd. Aangezien het startproduct en het eindproduct niet te scheiden waren, werd niet verder geprobeerd om deze twee analogen in elkaar om te zetten.

3.2.4 Koppeling van *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** en *trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester.HCl **84**

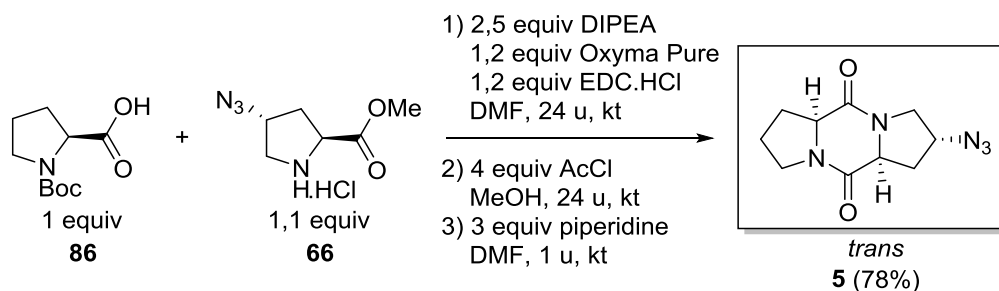
Naast de eerder vermelde koppeling van *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** met *L*-proline methylester.HCl **82**, werd ook de koppeling uitgevoerd van *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** met *trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester.HCl **84** (Schema 27). Aangezien ook hier een ketofunctie aanwezig is, trad in de tweede stap het probleem van dimethylacetaalvorming op. De opzuivering van **85** was identiek aan de opzuivering van **83**.


 Schema 27: Synthese van *trans*-hydroxy-dimethoxy-*L*-diproline

Er kon ook getracht worden om de Boc-ontscherming uit te voeren met TFA, zodat de ketofunctie behouden zou blijven, maar dit werd in deze masterthesis, wegens tijdsgebrek, niet ondernomen.

3.2.5 Koppeling van *N*-Boc-*L*-proline **86** en *trans*-4-azido-*L*-proline methyl-ester.HCl **66**

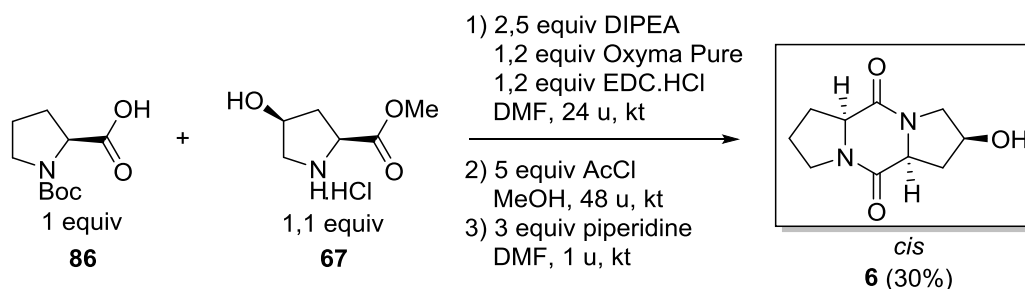
Voor de synthese van **5** werden de *L*-proline-analogen **86** en **66** gekoppeld (Schema 28). Na de eerste stap werd het ureïde-bijproduct van het product gescheiden via kolomchromatografie, waarna de Boc-ontscherming en ringsluiting plaatsvonden. Hierna werd het product nogmaals opgezuiverd via *reversed phase* automatische kolomchromatografie en dit leverde lichtgele kristallen op.



Schema 28: Synthese van *trans*-azido-*L*-diproline

3.2.6 Koppeling van *N*-Boc-*L*-proline **86** en *cis*-4-hydroxy-*L*-proline methyl-ester.HCl **67**

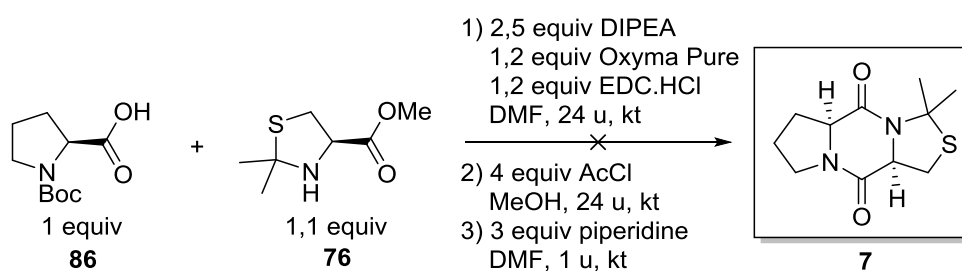
Voor de synthese van analogo **6** werden *N*-Boc-*L*-proline **86** en *cis*-4-hydroxy-*L*-proline methyl-ester.HCl **67** gekoppeld (Schema 29). Na het uitvoeren van de eerste stap werd het product opgezuiverd via *reversed phase* automatische kolomchromatografie en dit resulteerde in een geel schuim. Vervolgens werd de Boc-ontscherming uitgevoerd, waarbij eerst 4 equivalenten AcCl werden toegevoegd. Na 24 uur reactie werd slechts 50% conversie bereikt, waardoor een extra equivalent AcCl werd toegevoegd aan het reactiemengsel. Na nog eens 24 uur reactie was de Boc-ontscherming voltooid. Vervolgens werd de ringsluiting uitgevoerd waarna het product opgezuiverd werd met *reversed phase* automatische kolomchromatografie. Door de hoge polariteit van derivaat **6** was het niet eenvoudig om een geschikte gradiënt te vinden voor de scheiding van **6** en het piperidinezout. Bovendien trad een mechanisch verlies op door een probleem met de druk van de flashkolom. Dit verklaart het lage rendement van de reactie.



Schema 29: Synthese van *cis*-hydroxy-*L*-diproline

3.2.7 Koppeling van *N*-Boc-*L*-proline **86** en *L*-methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat **76**

Ten slotte werd getracht om *N*-Boc-*L*-proline **86** met *L*-methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat **76** te koppelen, maar er werd geen gekoppeld product gevormd na de eerste stap (Schema 30). Wanneer de reactie werd opgevolgd via LC-MS bleek dat er wel een beperkte hoeveelheid product werd gevormd, maar de gevormde verbinding was niet stabiel. De instabiliteit van de verbinding wordt mogelijk verklaard door de reactiviteit van het zwavelatoom. Aangezien de introductie van een zwavelatoom zorgt voor een verdere afwijking van *L*-diproline in vergelijking met de andere *L*-diproline-analogen, werd geen tijd meer geïnvesteerd in het vinden van een andere synthesemethode voor analoog **7**.



Schema 30: Poging tot synthese van methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat bevattend *L*-diproline-analoog

3.3 Biologische testen

De gesynthetiseerde moleculen werden getest op hun activiteit in biologische testen die ontwikkeld werden in de Vakgroep Biologie aan de Faculteit Wetenschappen. Oorspronkelijk was het de bedoeling om enkel attractie-assays te gebruiken, waarin de attractie van de diatomeeën naar *beads* die gecoat zijn met een *L*-diproline-analoog wordt geanalyseerd. Het is echter niet mogelijk om na te gaan of de analogen effectief coaten op de *beads*, waardoor een bijkomende assay ontwikkeld werd. Met de inhibitie-assay kan het inhiberend effect van een *L*-diproline-analoog in het medium onderzocht worden op de attractie naar *beads* die gecoat zijn met *L*-diproline, wat onafhankelijk is van de coating van de analogen op de *beads*.⁹¹

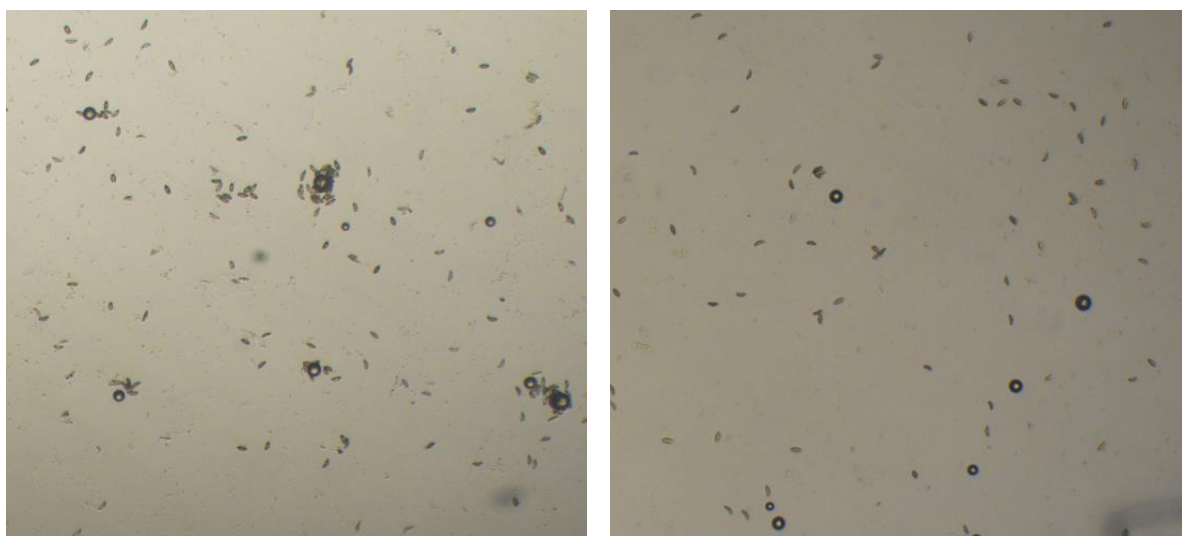
3.3.1 Algemeen

3.3.1.1 Procedure

Cellen van het migrerend paringstype (MT⁺) van *Seminavis robusta*, afkomstig van de 85A stam, werden geïnoculeerd in een 24-well plaat en werden behandeld met antibiotica om ongewenste groei van bacteriën te vermijden. In deze plaat konden de cellen gedurende twee dagen groeien. Daarna werden ze gedurende 36 uur in het donker gesynchroniseerd zodat ze zich allemaal in dezelfde fase van hun levenscyclus, namelijk de G₁-fase, bevonden. Vervolgens werd een sex inducing pheromone, SIP⁻, afkomstig van de 85B stam, aan de cellen toegevoegd en werden de cellen gedurende acht uur geconditioneerd. Na de conditionering werd *L*-diproline (*L*-DP) of een

analoog toegevoegd aan de cellen waaraan na vijf minuten ook *L*-DP(-analoog) gecoate *beads* werden toegevoegd. Deze *beads* werden gecoat door een *L*-DP(-analoog)-oplossing over een kolom bestaande uit *hydrophilic-lipophilic balanced* (HLB) *beads* te sturen zodat de *beads* 2 nmol *L*-DP(-analoog)/mg bevatten. Na het toevoegen van de *beads*, gemiddeld 150 per well, werd tien minuten gewacht, enerzijds zodat de *beads* tot de bodem konden zinken en anderzijds omdat de cellen bij het zinken van de *beads* verstoord geraken. Om de attractie naar de *beads* in kaart te brengen, werden van elke well acht foto's genomen met een lichtmicroscop, die dan vervolgens geanalyseerd werden met ImageJ.^{91,107} Voor de statistische dataverwerking werd gebruik gemaakt van een *Generalized Linear Model* (GLM), gebaseerd op een Poissonverdeling, in R versie 3.3.3. Met behulp van dit model konden verschillende behandelingen en herhalingen ten opzichte van elkaar vergeleken worden op basis van hun fractie attractieve *beads*. De p-waarden die in het vervolg van deze sectie worden weergegeven, werden op basis van deze vergelijking bepaald. De analyses werden telkens uitgevoerd op het 5%-significantieniveau. Er moet opgemerkt worden dat enkel in Figuur 19 de effectieve output van het model weergegeven wordt, terwijl Figuren 11 tot 18 de boxplotvoorstellingen van de gemeten waarden bij de verschillende testen voorstellen.

Om de attractie naar de *beads* te kwantificeren, werd het aantal cellen geteld dat aangetrokken werd tot een *bead* (Figuur 8). Het aantal cellen per *bead* werd ingedeeld in 11 klassen, namelijk 0 tot 10 cellen per *bead* en meer dan 10 cellen per *bead*. Om te bepalen hoeveel *beads* attractief waren, moest er een drempelwaarde gekozen worden om te bepalen vanaf welke klasse er kan gesproken worden van een attractieve *bead*. Daarvoor werden in eerder onderzoek inhibitie-assays uitgevoerd met verschillende celdensiteiten en verschillende concentraties *L*-DP.⁹¹ Per densiteit werden de verschillende drempelwaarden onderzocht en de geschikte densiteit en drempelwaarde werden gekozen op basis van het grootste verschil in attractie tussen een *L*-DP-concentratie van 0 en 10 μ M. Daaruit bleek dat voor de laagste densiteit ($7,1 \times 10^7$ cellen/m²) en voor een drempelwaarde van 1 het grootste verschil werd behaald. Op basis van de resultaten van deze assays werd beslist dat een *bead* attractief is vanaf er zich één cel aan de *bead* bevindt.⁹¹



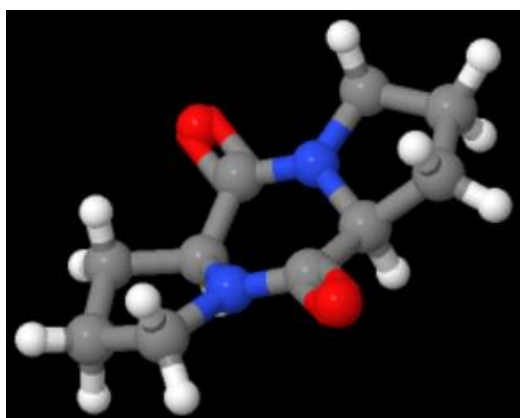
Figuur 8: Links: Hoge attractie van de cellen naar de beads; Rechts: Lage attractie van de cellen naar de beads

Bij de assays werden ook een positieve en negatieve controle inbegrepen. Bij de positieve controle werd de attractie van de diatomeeën naar *L*-DP gecoate *beads* gemeten zonder toevoeging van *L*-DP of een analoog aan het medium. Voor de negatieve controle werd de attractie naar ongecoate *beads* gemeten, wat dus de kans weergeeft dat een cel toevallig tegen een *bead* ligt. Elke test werd in vier herhalingen uitgevoerd om een duidelijker en statistisch betrouwbaar resultaat te verkrijgen.

3.3.1.2 *L*-diproline in de feromoonreceptor

Zoals vermeld in Sectie 2 is *L*-diproline een diketopiperazine waarop twee prolineringen zijn ingebouwd. De aanwezigheid van deze twee ringen zorgt voor conformationele rigiditeit van het cyclodipeptide. De conformatie van *L*-DP is belangrijk voor de binding met de receptor en speelt een belangrijke rol bij de SAR-studie.

Om de conformatie van een molecule te bepalen, kan gebruik gemaakt worden van de koppelingsconstanten die met behulp van ^1H NMR kunnen bepaald worden. Aan de hand van de Karplusvergelijking kan de dihedrale hoek berekend worden die informatie geeft over de hoek tussen protonen op naburige atomen. *Vičar et al.* voerden een conformatiestudie uit van verschillende DKP'en door de koppelingsconstanten tussen NH en C_αH te bepalen, wat echter niet mogelijk was bij *L*-DP door de afwezigheid van een proton op het stikstofatoom. Daarom kon de conformatie van *L*-DP enkel bepaald worden aan de hand van chemische verschuivingen en koppelingsconstanten van andere protonen. Op basis van modelanalyses en aan de hand van de intensiteit van signalen in ^1H NMR kon besloten worden dat *L*-DP een C_2 symmetrie vertoont. Ook bleek dat, in vergelijking met cyclo(Gly-*L*-Pro), de invoer van een extra prolinering niet tot een grote verandering in de conformatie leidde. Aangezien cyclo(Gly-*L*-Pro) voorkomt in een bootconformatie, bepaald aan de hand van de koppelingsconstanten en dihedrale hoeken, kan afgeleid worden dat ook *L*-DP in een bootconfiguratie voorkomt.¹⁰⁸ Om een duidelijk beeld te krijgen van deze conformatie, wordt in Figuur 9 de kristalstructuur van *L*-DP weergegeven. Deze werd bepaald door *Friedrich et al.* aan de hand van X-stralen kristallografie.¹⁰⁹



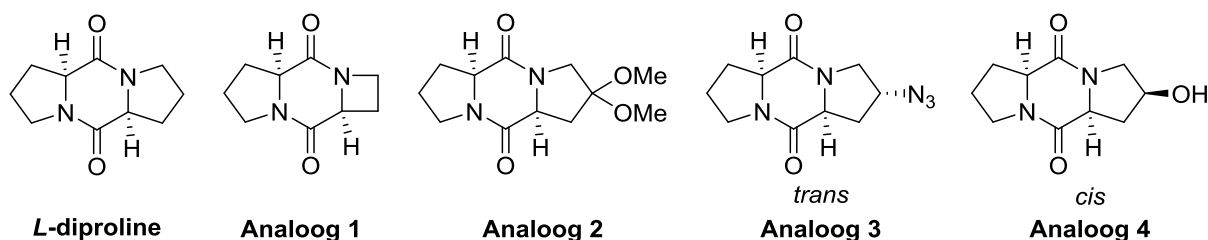
Figuur 9: Kristalstructuur van *L*-diproline¹⁰⁹

De vraag kan echter gesteld worden of de exacte structuur van *L*-DP van belang is bij de feromoonwerking. In het onderzoek naar de identificatie van het feromoon van *S. robusta* bleek dat *D*-diproline (*D*-DP) gelijkaardige feromooneffecten vertoonde. Deze vaststelling zou mogelijk kunnen wijzen op een *swipe card* herkenning door de receptor, waarbij de molecule geometrisch in de receptor moet passen, maar waarbij het voornamelijk de elektronische eigenschappen zijn die tot activering leiden. Anderzijds zou de vaststelling ook verklaard kunnen worden door een degradatieproces waarbij ook uit *D*-DP, door racemisatie of andere transformaties, een actief product verkregen wordt.²¹

3.3.1.3 Geteste *L*-diproline-analogen

Wegens de beperkte tijd voor deze masterthesis was het niet mogelijk om alle gesynthetiseerde analogen te testen. Daarom werden de vier meest interessante analogen geselecteerd om te onderwerpen aan de biologische testen. Vooraleer de verschillende analogen konden gebruikt worden, werden ze opgezuiverd met preparatieve HPLC om de laatste onzuiverheden te verwijderen. Deze onzuiverheden zouden immers de resultaten van de testen kunnen beïnvloeden. Na de opzuivering werd 1 mg van de verbinding afgewogen met de automatische balans en opgelost in Milli-Q water om een oplossing van 5 mM te bekomen.

Het eerste geteste analoog werd geselecteerd op basis van de sterke gelijkenissen met *L*-DP. Eén van de *L*-prolineringen werd vervangen door een azetidinerig, waardoor een iets kleinere molecule bekomen werd (Figuur 10, Analoo 1). Hoewel het feromoon symmetrisch is, werd slechts één van de prolineringen vervangen wat een niet-symmetrische verbinding opleverde. Als tweede analoog werd gekozen voor het dimethylacetaal-analoog (Figuur 10, Analoo 2). Alhoewel het oorspronkelijk niet de bedoeling was om dit analoog te synthetiseren, zou het interessant kunnen zijn om te achterhalen of de twee methoxygroepen voor sterische hinder zorgen en de binding met de receptor belemmeren. In eerder onderzoek werd *trans*-methoxy-*L*-diproline getest, waardoor de invloed van een extra methoxygroep kan nagegaan worden.⁹¹ Vervolgens werd het *L*-DP-analoog getest waarop *trans* een azidegroep is ingebouwd (Figuur 10, Analoo 3). Zoals vermeld in Sectie 3.1.5 zou een azidegroep kunnen gebruikt worden als linker voor de aanhechting van een fluorofoor, waarbij men spreekt van klikchemie.^{102,103} Het *cis*-enantiomeer werd in het kader van een bachelorproef getest, waardoor het verschil in activiteit door een verschil in stereochemie bestudeerd kan worden.¹¹⁰ Ten slotte werd ook het analoog getest waarop *cis* een hydroxylgroep werd ingevoerd (Figuur 10, Analoo 4). Door de aanwezigheid van de hydroxylgroep, werd de polariteit van de verbinding verhoogd ten opzichte van *L*-DP.



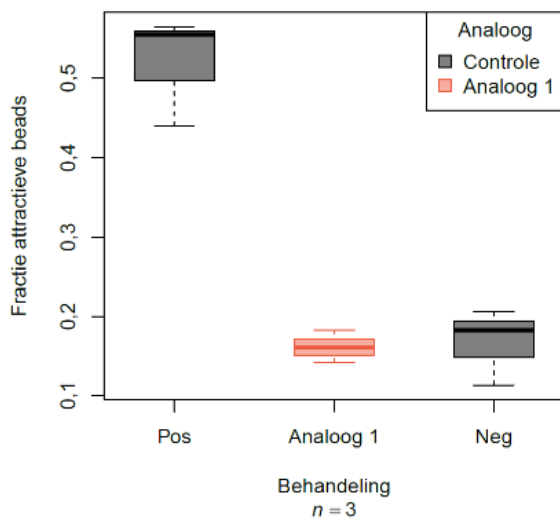
Figuur 10: Geteste *L*-diproline-analogen

3.3.2 Attractie-assay

Bij de attractie-assay was het de bedoeling om de attractie van de diatomeeën naar *beads* gecoat met één van de voorgenoemde analogen, te onderzoeken. De diatomeeën werden geïnoculeerd in een medium waarin ze 48 uur konden groeien. Nadien werden ze gesynchroniseerd in het donker en ten slotte werden ze gedurende acht uur geconditioneerd met SIP⁻. Hierna werd, in tegenstelling tot de inhibitie-assay, geen L-DP(-analoog) in het medium toegevoegd, maar werden enkel *beads* gecoat met het analoog in het medium gebracht. Vervolgens werden per well acht foto's genomen waarop het aantal attractieve *beads* werd geteld.⁹¹

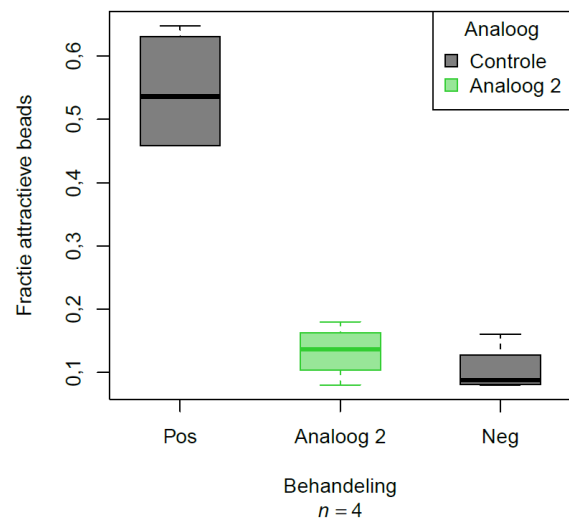
3.3.2.1 Resultaten en discussie

Evaluatie van de attractie van Analoog 1



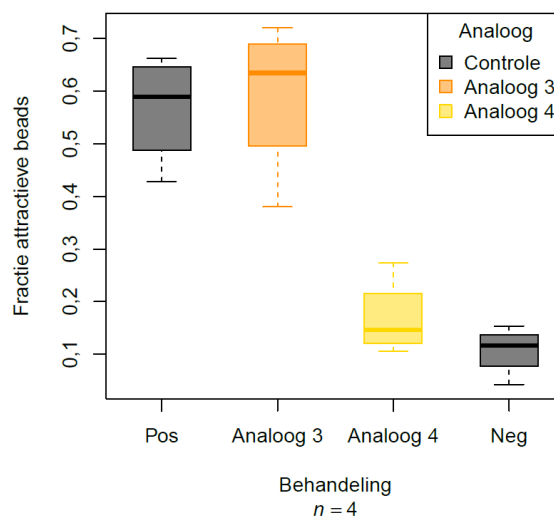
Figuur 11: Attractie-assay van Analoog 1

Evaluatie van de attractie van Analoog 2



Figuur 12: Attractie-assay van Analoog 2

Evaluatie van de attractie van Analogen 3 en 4



Figuur 13: Attractie-assay van Analogen 3 en 4

Op basis van de resultaten van de attractie-assays lijkt het alsof *beads* gecoat met Analogen 1, 2 en 4 geen attractie van de diatomeeën induceren, aangezien de attracties niet significant verschillend zijn van de negatieve controle (Figuren 11-13). Het zou echter incorrect zijn om dit te besluiten, omdat dit mogelijk aan de coating van de *beads* zou kunnen liggen. Bij de coating van de *beads* wordt een oplossing van het analoog in water over een kolom met *beads* gestuurd. Hiervoor werden waterbevochtbare Oasis® HLB-*beads* gebruikt, die zowel een hydrofiele groep, *N*-vinylpyrrolidon, als een lipofiele groep, divinylbenzeen, bezitten. Het is de hydrofiele groep die zorgt voor de retentie van de polaire verbindingen en dus voor de coating van de *beads*.¹¹¹ De *beads* werden uit de kolom gespoeld met behulp van Milli-Q water en ook in de well met de diatomeeën werden ze aan waterig medium toegevoegd. De polaire componenten zullen vermoedelijk weer in het water oplossen en niet gecoat blijven op de *beads*. Daarom vallen er uit deze attractie-assay voor Analogen 1, 2 en 4 geen besluiten te trekken. Hierbij moet opgemerkt worden dat de resultaten van Analoo 1 slechts gebaseerd zijn op drie herhalingen, aangezien de vierde herhaling op basis van de positieve controle een significant lagere attractie vertoonde dan de andere herhalingen.

Voor Analoo 3 is de attractie naar de *beads* niet significant verschillend van de positieve controle, wat wil zeggen dat dit analoog een gelijkaardig attractief effect vertoont als het feromoon *L*-DP (Figuur 13). Dit impliceert mogelijk een feromoon-effect en moet zeker verder onderzocht worden met behulp van de inhibitie-assays. Ook het *cis*-analoog, dat in een gelijktijdig onderzoek in het kader van een bachelorproef werd getest, vertoonde hetzelfde resultaat, waaruit kan besloten worden dat de attractie onafhankelijk is van de stereochemie van de azidegroep.¹¹⁰

3.3.3 Inhibitie-assay

Bij de inhibitie-assay werden enkel *beads* gebruikt die gecoat waren met het feromoon *L*-DP. In de omgeving van de *bead* ontstaat een *L*-DP-gradiënt, waardoor de diatomeeën de gradiënt naar de *beads* zullen volgen en op deze manier ertoe aangetrokken worden. De bedoeling van de inhibitietest is om dit fenomeen te onderdrukken door het toevoegen van *L*-DP of een analoog in het medium. Als deze component met de *L*-DP-receptoren van de diatomeeën kan interageren, geraken de diatomeeën verward, wat leidt tot een verlaagde attractie naar de *beads*. Dit effect werd vastgesteld bij *L*-DP en op deze manier kan onderzocht worden of een analoog in staat is om een gelijkaardig inhiberend effect te veroorzaken en dus ook kan interageren met de feromoonreceptor.

In voorgaand onderzoek werden zes verschillende concentraties van *L*-DP onderzocht op hun inhiberend effect: 0 μ M; 0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M en 100 μ M. Het testen van de verschillende concentraties resulteerde in een dosis-responscurve. Daaruit bleek dat er geen significant verschil viel waar te nemen tussen concentraties van 0,1 μ M tot 100 μ M ten opzichte van de negatieve controle, wat wil zeggen dat bij deze concentraties een sterk inhiberend effect plaatsvindt. Bovendien vergt het verzamelen van data voor een dosis-responscurve veel werk, waardoor besloten werd om slechts met drie concentraties verder te werken, namelijk 0,01 μ M; 0,1 μ M en 10 μ M, wat respectievelijk een lage, de fysiologische en een hoge concentratie zijn.⁹¹

3.3.3.1 Resultaten en discussie

Het vermogen tot inhibitie van de analogen dat in deze assays onderzocht wordt, mag niet zomaar gelijkgesteld worden aan een feromoneffect. Enerzijds zou het analoog als feromoon kunnen optreden en een gelijkaardig effect veroorzaken als *L-DP*, wat kan bevestigd worden met attractie-assays. Als hieruit blijkt dat de diatomeeën aangetrokken worden tot *beads* die gecoat zijn met dit analoog, kan het feromoneffect bevestigd worden.

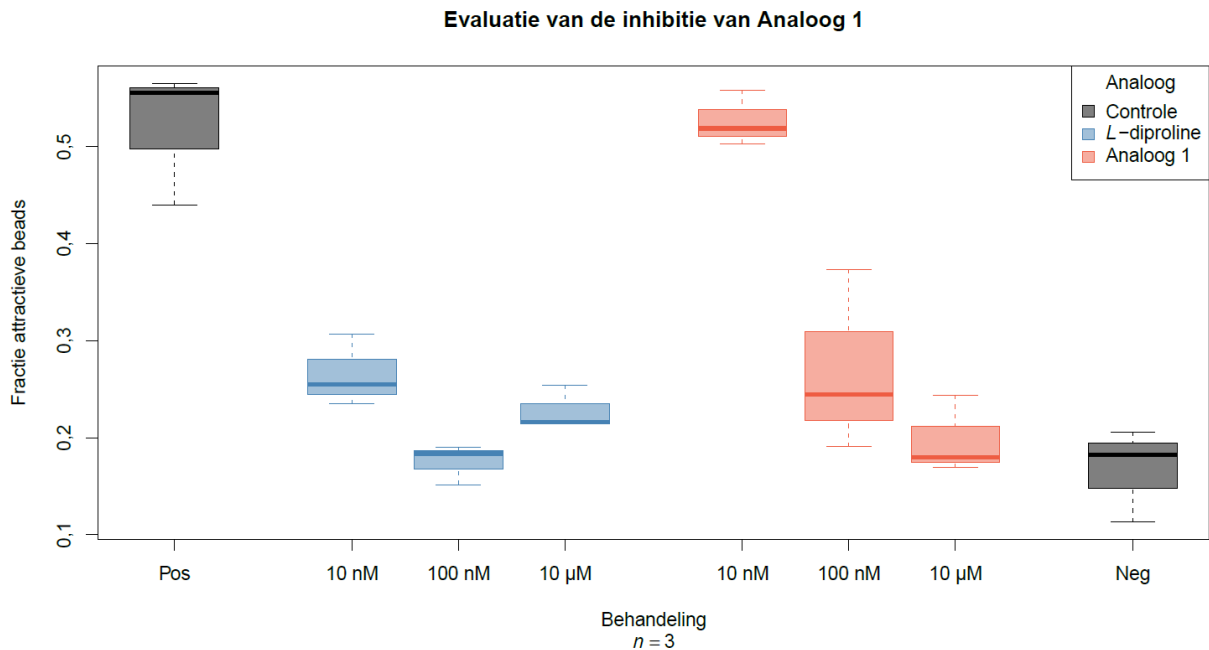
Anderzijds zou de inhibitie ook te wijten kunnen zijn aan een blokkering van de receptor van het feromoon. Hierbij bindt het analoog met de receptor, maar zorgt niet voor de respons waar het feromoon wel verantwoordelijk voor is, namelijk paarvorming en voortplanting.

Ten slotte moet ook het toxisch effect van de analogen onderzocht worden. Wanneer een analoog inhiberend werkt, wil dit zeggen dat de attractie naar de gecoate *bead* daalt. Dit zou echter kunnen zijn omdat de diatomeeën dood zijn of een verminderde activiteit vertonen door de toxiciteit van de verbinding. Om de toxiciteit van de analogen te onderzoeken, zou de efficiëntie van fotosysteem II kunnen gemeten worden na het toevoegen van het analoog aan het medium waarin de diatomeeën zich bevinden. Fotosysteem II is verantwoordelijk voor de lichtreacties van de fotosynthese en de activiteit ervan kan onderzocht worden met *Pulse Amplitude Modulated* (PAM) Fluorometrie. Hierbij worden met behulp van korte lichtpuls en een sterke lichtpuls fluorescentiewaarden verzameld waaruit de efficiëntie van fotosysteem II kan bepaald worden. Dit levert een PAM-waarde op die een indicatie geeft van de hoeveelheid licht die geabsorbeerd werd door chlorofyl en dus gebruikt werd in dit fotosysteem. Metingen kunnen uitgevoerd worden na het toevoegen van een *L-DP*-analoog aan het medium, waarna uit de PAM-waarden de verandering in activiteit van de cellen kan achterhaald worden.¹¹² Op dezelfde manier werd voorafgaand aan elke biologische test de hoeveelheid actieve cellen in de well-plaat gemeten.

In deze masterthesis werden enkel inhibitie- en attractie-assays uitgevoerd, dus kan er enkel iets gezegd worden over het inhiberend effect van de verbindingen, maar niet over de oorsprong ervan. De resultaten voor Analoog 1 worden weergegeven in Figuur 14, waarbij moet opgemerkt worden dat de resultaten, net zoals bij de attractie-assay, slechts gebaseerd zijn op drie herhalingen. Bij het testen van Analoog 1 valt een duidelijke inhibitie van de attractie op vanaf een concentratie van 100 nM, met een attractie bij 10 μ M die niet significant verschillend is van de negatieve controle. Bij een concentratie van 10 nM is de attractie niet significant verschillend van de positieve controle, waaruit besloten kan worden dat het analoog bij deze concentratie geen inhiberend effect vertoont. Door het uitvoeren van extra herhalingen kan nagegaan worden of het resultaat van de vierde herhaling een éénmalig afwijkend resultaat is.

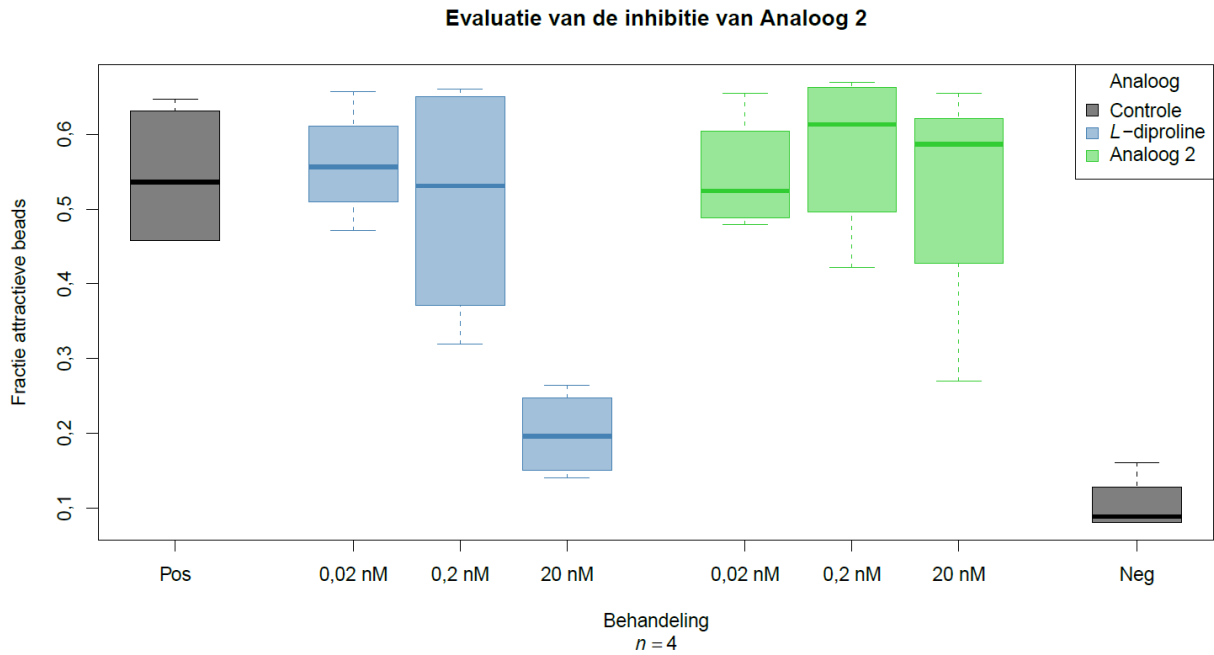
Het geteste analoog bezit een kleinere ring dan *L-DP*, maar is structureel sterk gelijkend op het feromoon. Uit de test blijkt dat een analoog met een kleinere ring voornamelijk bij hoge concentraties een gelijkaardig inhiberend effect vertoont als het feromoon. Uit ¹H NMR studies is gebleken dat Analoog 1, net zoals het feromoon in een bootconfiguratie voorkomt. Deze bootconfiguratie blijkt wel dieper te zijn dan bij het feromoon het geval is, maar aan de hand van

deze biologische testen blijkt dat dit de interactie met de receptor niet beïnvloedt. Of dit effectief een feromoneffect is, moet nog verder onderzocht worden aangezien dit ook te wijten kan zijn aan bovenvermelde toxiciteit of receptorblokkering.

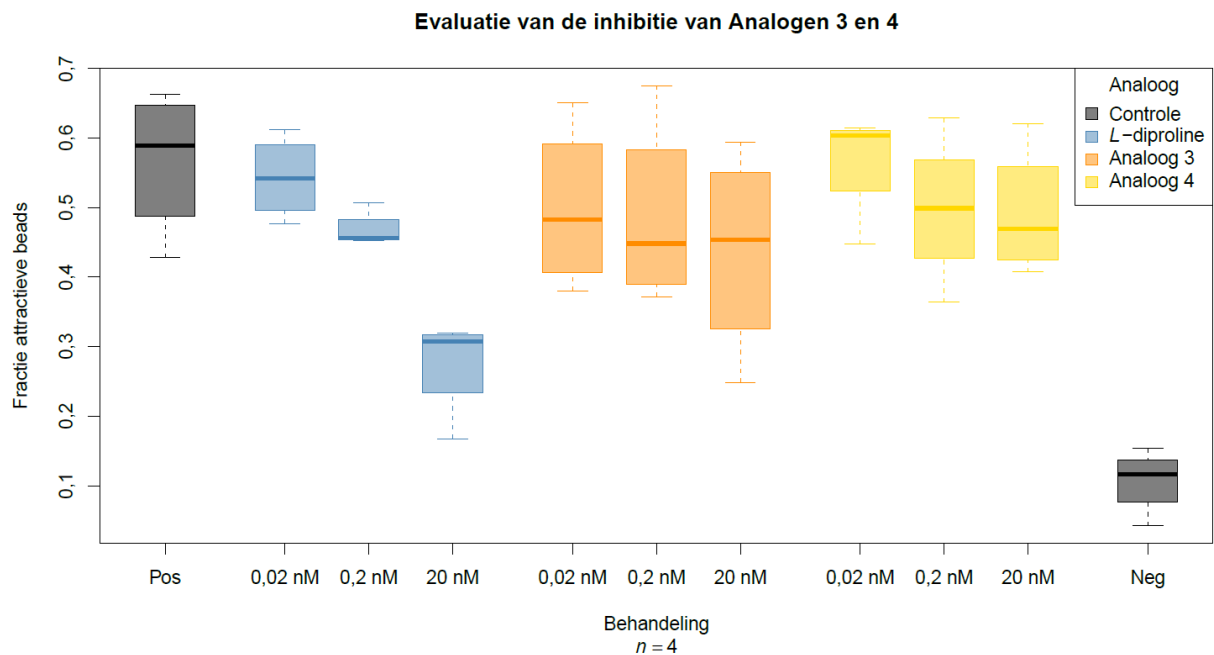


Figuur 14: Inhibitie-assay van Analoog 1 bij 10 nM, 100 nM en 10 µM

Vervolgens werden voor Analogen 2 tot 4 een aantal testen uitgevoerd bij lagere concentraties, namelijk 0,02 nM; 0,2 nM en 20 nM. Dit is te wijten aan een fout in de toegevoegde concentratie aan de well-platen, maar kan wel interessant zijn om te bekijken of duidelijk wordt vanaf welke concentratie een inhiberend effect valt waar te nemen. Er valt duidelijk op te merken dat in beide uitgevoerde testen de diatomeeën gevoeliger zijn voor lage concentraties *L*-DP dan voor de analogen, wat ook wel logisch is aangezien dit het feromoon is waarmee de receptor in de natuur interageert. In Figuur 15 is enkel de hoogste concentratie van *L*-DP significant verschillend van de positieve controle ($p < 0,001$). In Figuur 16 is duidelijk dat al vanaf een concentratie van 0,2 nM *L*-DP een daling in de attractiviteit valt waar te nemen en zowel de resultaten voor 0,2 nM als 20 nM zijn significant verschillend van de positieve controle (respectievelijk $p = 0,005$ en $p < 0,001$), waarbij ook opvalt dat de spreiding op de *L*-DP-resultaten lager ligt dan bij Figuur 15. Wanneer dan gekeken wordt naar de geteste analogen kan besloten worden dat voor Analoog 2 de attractie bij alle geteste concentraties niet significant verschillend is van de positieve controle. Voor Analoog 3 is de attractie bij de laagste concentratie niet significant verschillend van de positieve controle, wat wel het geval is voor de concentraties 0,2 nM en 20 nM (respectievelijk $p = 0,022$ en $p < 0,001$). Voor Analoog 4 valt een lichte daling in de attractie waar te nemen, maar deze is enkel significant verschillend van de positieve controle bij een concentratie van 0,2 nM ($p = 0,048$). Er valt echter een grote spreiding op de resultaten op te merken, waardoor geen duidelijke besluiten kunnen getrokken worden.



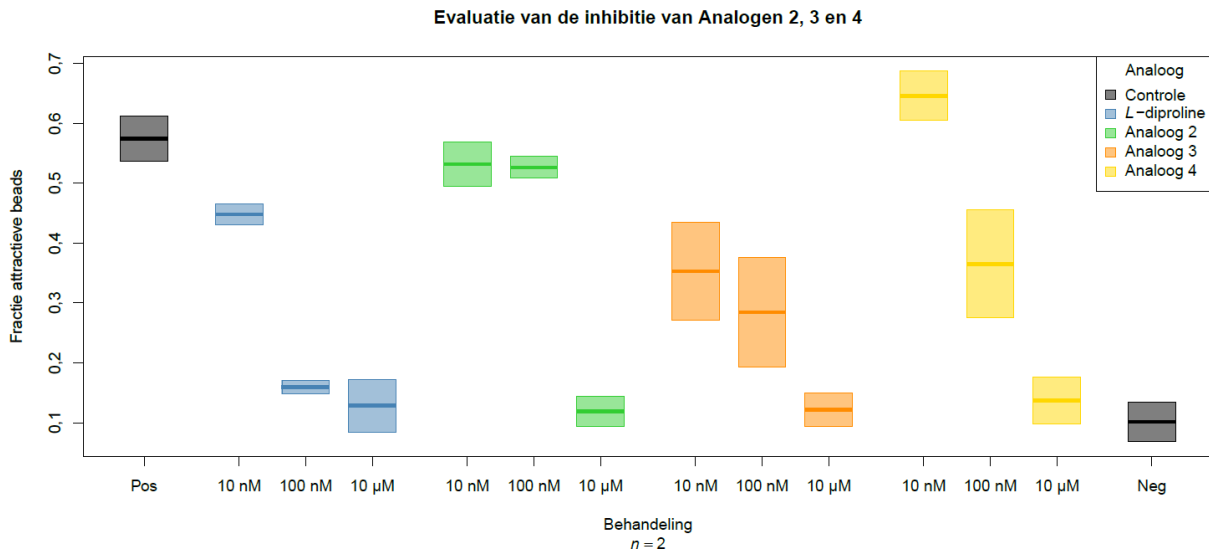
Figuur 15: Inhibitie-assay van Analooq 2 bij 0,02 nM; 0,2 nM en 20 nM



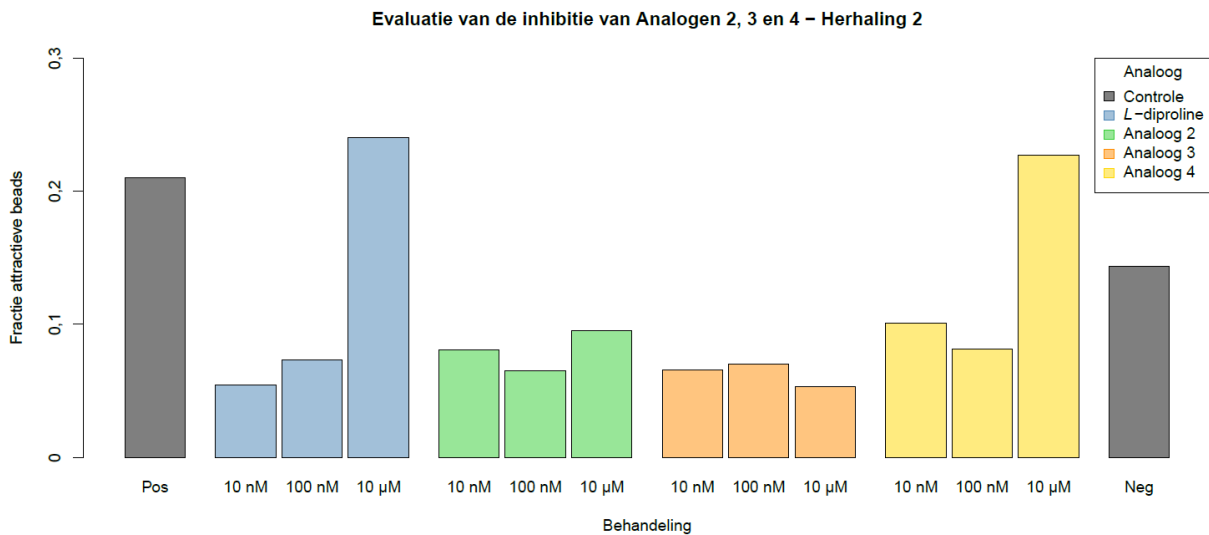
Figuur 16: Inhibitie-assay van Analogen 3 en 4 bij 0,02 nM; 0,2 nM en 20 nM

Ten slotte werden Analogen 2 tot 4 ook getest bij de vooraf gekozen concentraties, namelijk 10 nM, 100 nM en 10 μ M. Voor alle analogen vallen hier duidelijke inhiberende effecten op bij de hoogste concentratie en dit is voor alle analogen niet significant verschillend van de negatieve controle (Figuur 17). Er moet hier wel opgemerkt worden dat deze resultaten slechts gebaseerd zijn op twee herhalingen. De test werd wel in viervoud uitgevoerd, maar bij de eerste twee herhalingen bleken de diatomeeën niet voldoende gegroeid te zijn, waardoor de celdensiteit te laag was. Bij de eerste uitvoering werd er geen attractie waargenomen voor de verschillende behandelingen, terwijl dat bij de tweede herhaling voor de positieve controle wel het geval was.

Daarom werden de foto's van de tweede herhaling toch geanalyseerd wat de resultaten opleverde die in Figuur 18 zijn weergegeven. Er valt meteen op dat deze resultaten niet relevant zijn, aangezien er duidelijk een veel lagere attractie is in vergelijking met de resultaten van herhalingen 3 en 4 (Figuur 17). Dit valt mogelijk te verklaren door de dichtheid van de cellen in het medium, die op basis van de PAM-waarden significant lager lag ten opzichte van de voorgaande testen. Hierdoor waren er te weinig cellen aanwezig in de well-plaat om duidelijk attractie waar te nemen. Bij herhalingen 3 en 4 werd dit probleem voorkomen door de cellen 24 uur langer te laten groeien.



Figuur 17: Inhibitie-assay van Analogen 2, 3 en 4 bij 10 nM, 100 nM en 10 µM



Figuur 18: Inhibitie-assay van Analogen 2, 3 en 4 bij 10 nM, 100 nM en 10 µM – Herhaling 2

Wanneer de resultaten per analoog bekeken worden, blijkt dat Analoog 2 enkel bij een hoge concentratie (10 µM) inhiberend werkt en dat de vertoonde attractie bij lage concentraties niet significant verschillend is van de positieve controle (10 nM en 100 nM). In vorig onderzoek werd het *trans*-methoxy-*L*-diproline-analoog getest, wat qua structuur sterk gelijkend is op Analoog 2. Uit de inhibitietesten van dat analoog bleek dat het een gelijkaardig inhiberend effect vertoont als

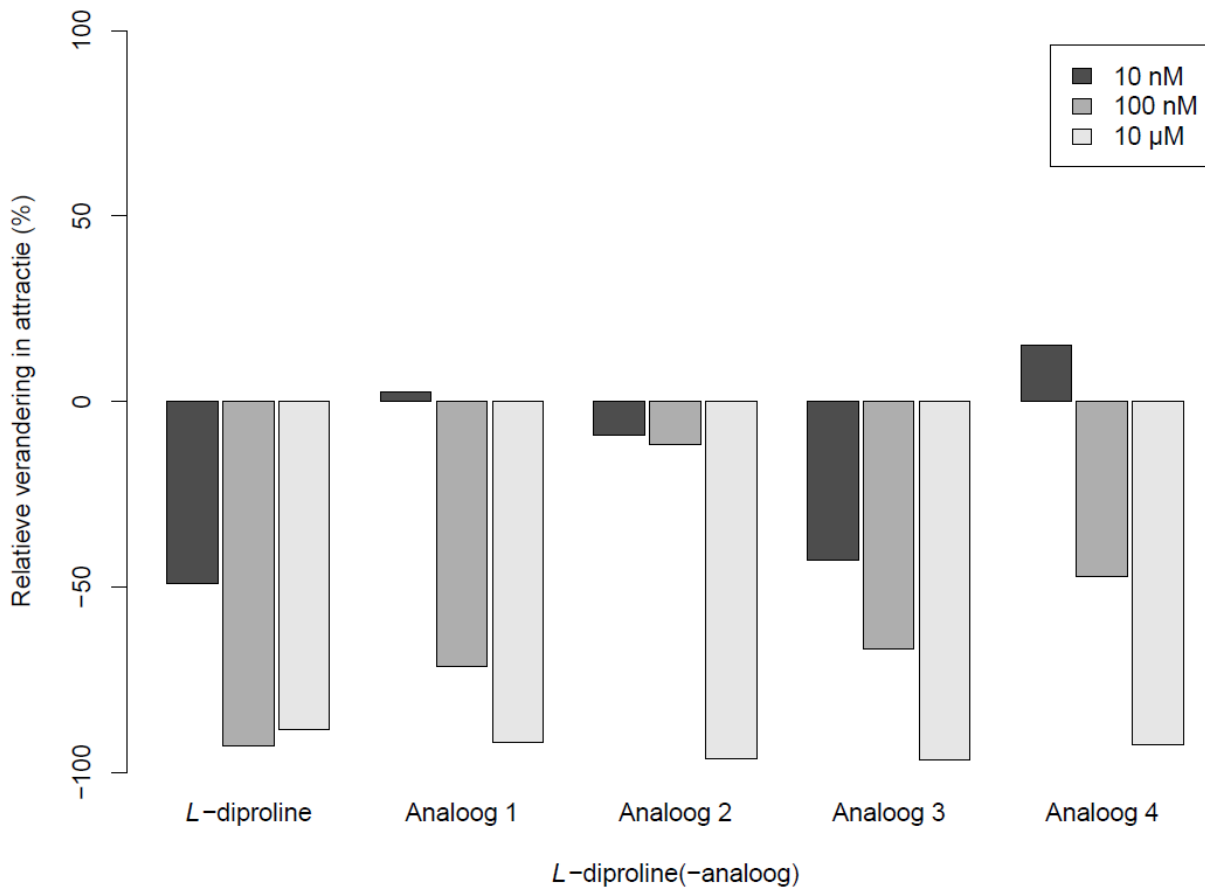
L-DP.⁹¹ Dus ondanks de aanwezigheid van één of twee methoxygroepen kan de molecule nog altijd interageren met de receptor en zorgen deze groepen niet voor teveel sterische hinder. Er moet hier uiteraard wel opgemerkt worden dat dit laatste enkel klopt als de verbinding niet toxisch blijkt of de receptor blokkeert.

Uit de resultaten van de inhibitie-assay van Analoog 3 valt duidelijk een stijging van de inhibitie waar te nemen met stijgende concentratie van het analoog, die voor alle concentraties significant verschillend is van de positieve controle ($p < 0,001$). Er moet hier wel rekening gehouden worden met de grote spreiding op de resultaten en bovendien zijn de resultaten slechts gebaseerd op twee herhalingen. Om een duidelijker beeld te verkrijgen, moet de test zeker nog aangevuld worden met extra replicaten. Aangezien de attractie-assay voor dit analoog een attractief effect van het analoog aantoonde, zou dit mogelijk op een feromoon-effect kunnen wijzen. Hetzelfde effect werd ook bij eerdere testen van het *cis*-azide-*L*-diproline-analoog waargenomen, wat impliceert dat de inhibitie onafhankelijk is van de stereochemie van de azidegroep.¹¹⁰ Het feit dat dit analoog zich gedraagt zoals *L*-DP is positief, want dit wil zeggen dat de azidegroep de activiteit van het feromoon niet beïnvloedt, wat belangrijk is als het zou gebruikt worden voor de aanhechting van een fluorofoor (zie Sectie 3.1.5).

Ten slotte valt ook voor Analoog 4 een stijging in de inhibitie waar te nemen met stijgende concentratie van het analoog. Alhoewel het lijkt alsof de attractie bij de laagste concentratie hoger is dan bij de positieve controle, zijn beide niet significant verschillend. Dit analoog vertoont vanaf 100 nM een inhiberend effect, waarvan verder moet onderzocht worden of dit te linken is aan een feromoon-effect.

Deze resultaten zijn gebaseerd op de gemeten attractiewaarden waarvan een gemiddelde op basis van de verschillende herhalingen werd bepaald. Echter, door verschillen in handelingen of activiteit van de diatomeeën tussen de verschillende herhalingen worden er verschillen in resultaten waargenomen, waarnaar gerefereerd wordt als een plaaffect. De coëfficiënt van het plaaffect wordt geschat door het GLM, zodanig dat het effect niet aanwezig is in de uiteindelijke geschatte attractiewaarden. Deze waarden worden bovendien lineair herschaald zodat de positieve controle op 0 wordt gesteld en de negatieve controle op -100, waardoor het mogelijk wordt de resultaten van de verschillende testen met elkaar te vergelijken. Dit wordt weergegeven in Figuur 19, waarin duidelijk te zien is welke analogen de attractie inhiberen. De waarden voor *L*-DP die hier worden weergegeven, zijn gebaseerd op vijf herhalingen, terwijl de resultaten van Analoog 1 bepaald zijn op basis van drie herhalingen en die van Analogen 2 tot 4 op twee herhalingen.

Evaluatie van de inhibitie van de *L*-diproline analogen



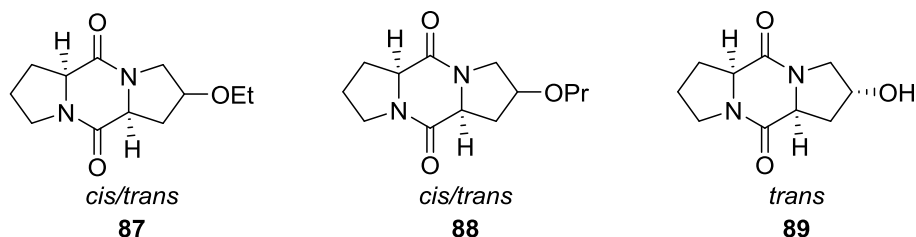
Figuur 19: Relatieve verandering in de attractie van de verschillende analogen op basis van de GLM output

Deze resultaten geven een betrouwbaarder beeld van het inhiberend vermogen van de verschillende analogen dan de boxplotvoorstellingen door de wegwerking van het plaatteffect. Toch kunnen hieruit dezelfde besluiten getrokken worden als bij de eerder weergegeven resultaten. Alle analogen werken bij de hoogste concentratie inhiberend en zorgen voor een attractie die niet significant verschillend is van de negatieve controle. De attractie is bijgevolg even hoog als in het geval dat enkel ongecoate beads aanwezig zijn. Zoals eerder vermeld is 100 nM de fysiologische concentratie, dus de concentratie waarin *L*-DP wordt afgescheiden door de diatomeeën. Enkel voor *L*-DP werkt deze concentratie even inhiberend als een concentratie van 10 µM, waaruit valt af te leiden dat de diatomeeën gevoeliger zijn voor het feromoon dan voor de analogen. Bij de laagste concentratie, 10 nM, is naast *L*-DP enkel Analoog 3 in staat om de attractie naar de *beads* significant te verlagen terwijl de andere analogen geen enkel inhiberend effect vertonen indien wordt vergeleken met de positieve controle, waarbij enkel *L*-DP-beads in het medium aanwezig zijn.

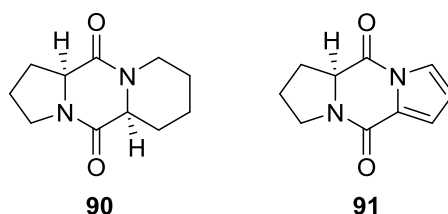
Wat opvalt uit alle testen is dat er vaak een grote spreiding doorheen de verschillende herhalingen op de resultaten aanwezig is, en dit zowel voor de verschillende herhalingen per test voor de analogen, als voor *L*-DP. Bovendien is het belangrijk om de resultaten niet onderling te vergelijken zonder rekening te houden met de positieve en negatieve controles.

3.3.4 Verder onderzoek

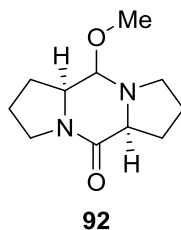
In deze masterthesis werden slecht vier analogen getest, bijgevolg is het duidelijk dat er nog tal van andere analogen op hun SAR moeten getest worden om meer informatie te verkrijgen omtrent de feromoonreceptor. Dit kan zowel met attractie- als inhibitie-assays zoals in deze masterthesis, maar ook testen om de toxiciteit of de receptorblokkering na te gaan, zouden moeten uitgevoerd worden. Het grote probleem van de attractie-assays is het vermogen om het analoog te coaten op de *beads*. Voor drie van de vier analogen werd geen attractie waargenomen, wat mogelijk te wijten is aan het onvermogen van het analoog om te coaten. Daarom zouden in volgende testen minder polaire analogen kunnen getest worden, bijvoorbeeld door de introductie van alkoxygroepen die langer zijn dan de eerder geteste methoxygroep, zoals een ethoxy- (**87**) of propyloxygroep (**88**). Als deze analogen meegenomen worden in de inhibitie-assays kan daarnaast ook nagegaan worden of de receptor in staat is om met een analoog met een grote zijketen te interageren of sterisch gehinderd wordt. Aangezien in deze thesis enkel de invloed van *cis*-hydroxy-*L*-diproline op de receptor werd nagegaan, kan ook het *trans*-analoog **89** in verder onderzoek getest worden om te bekijken of de inhibitie, net zoals bij azido-*L*-diproline, onafhankelijk is van de stereochemie.¹¹⁰



Hiernaast zou ook kunnen gevarieerd worden in de basisstructuur van *L*-DP door bijvoorbeeld één van de *L*-prolineringen te vervangen door een piperidinering (**90**). Aangezien in deze masterthesis de invloed van een kleinere ring op de inhibitie werd nagegaan, kan op die manier het omgekeerde, namelijk de invloed van een grotere ring, onderzocht worden. Bovendien kan, naast een aanpassing aan de ringgrootte, ook de invloed van een onverzadigde ring nagegaan worden, bijvoorbeeld door de vervanging van *L*-proline door pyrrool (**91**).



Naast deze mogelijke variaties in functionele groepen en ringstructuur, zou het belang van de aanwezigheid van de carbonylgroep in de diketopiperazinestructuur kunnen onderzocht worden, door deze te vervangen door een methoxygroep (**92**).



Naast deze mogelijke aanvullingen voor het onderzoek naar de SAR, zou ook de biologische test geoptimaliseerd kunnen worden om de spreiding op de resultaten te minimaliseren. Voor de verwerking van de data van de uitgevoerde testen werd een *bead* attractief gedefinieerd als er zich hiertegen één diatomee bevond. Op deze manier wordt er evenwel geen onderscheid gemaakt tussen een *bead* waartegen zich tien diatomeeën bevinden ten opzichte van een *bead* waartoe slechts één diatomee is aangetrokken. Een oplossing om hier toch een onderscheid in te maken, is het toekennen van gewichten aan de verschillende klassen waarin de *beads* worden ingedeeld. Zo zouden bijvoorbeeld *beads* waartegen zich drie of minder diatomeeën bevinden als minder attractief kunnen beschouwd worden ten opzichte van *beads* met vier of meer diatomeeën. Dit zou mogelijk helpen om de spreiding op te resultaten te verlagen.

Het uiteindelijke doel van het onderzoek is de ontwikkeling van een probe aan de hand waarvan de feromoonreceptoren kunnen geïdentificeerd worden. De probe bestaat uit een *L*-DP-analoog dat aan één uiteinde een diazinegroep bezit waarmee het kan binden met de proteïnen in de cel en waarbij aan het andere uiteinde eventueel een azidegroep kan ingebouwd worden voor de binding van een fluorofoor. Hiervoor is het de bedoeling om zowel *L*-DP-analogen te vinden die wel binden met de feromoonreceptor als analogen die niet binden. Zoals vermeld in Sectie 3.1.5 wordt door de aanwezigheid van de diazinegroep een carbeen gecreeërd dat kan binden met alle proteïnen en al dan niet ook met de feromoonreceptor. Met behulp van massaspectrometrie *proteomics* kunnen de resultaten van een bindend en niet-bindend analoog vergeleken worden om zo de feromoonreceptoren te identificeren.

Hoofdstuk 4

Samenvatting en besluit

4.1 Samenvatting

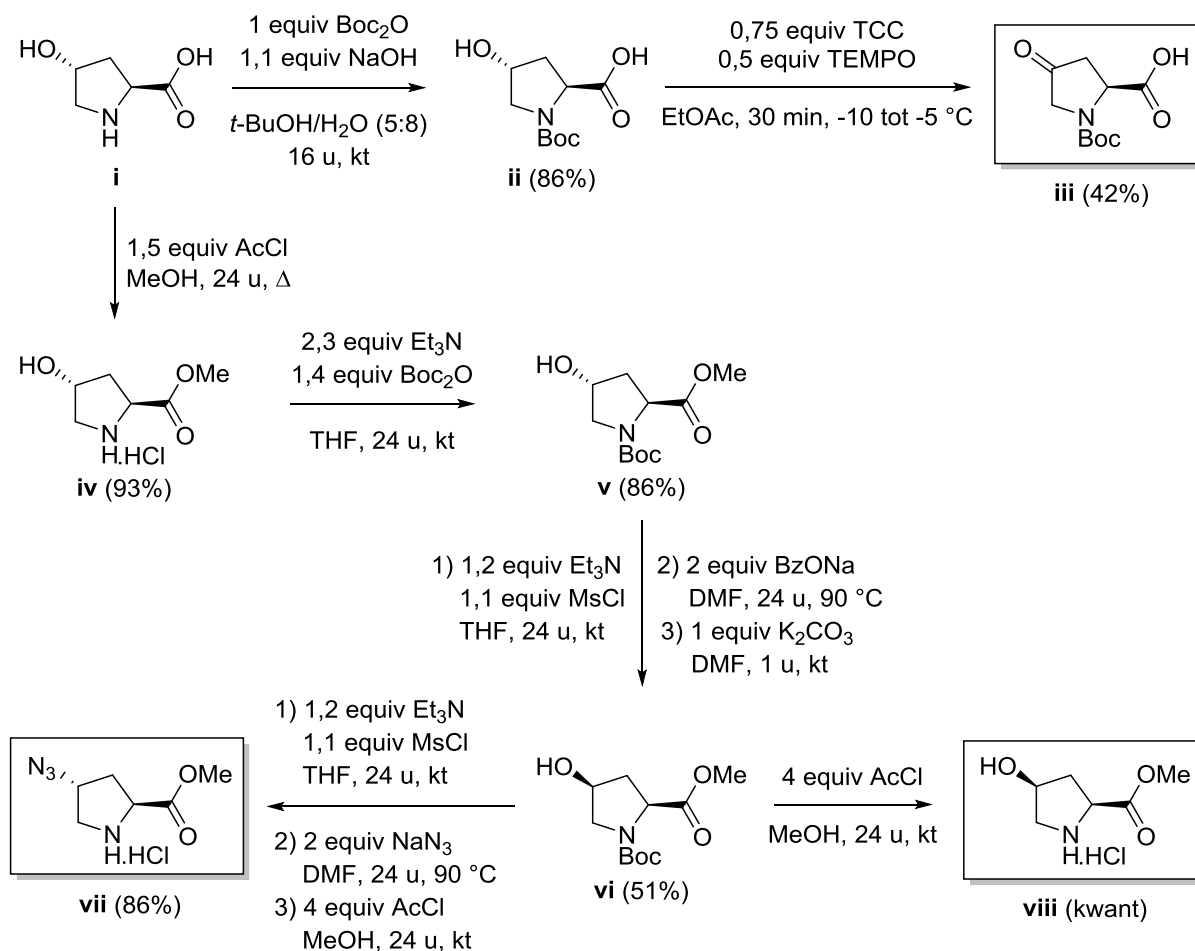
In deze masterthesis was het de bedoeling om aan de hand van structuur-activiteitsrelaties meer informatie te verkrijgen omtrent de feromoonreceptor van het diatomee *Seminavis robusta*. Gillard *et al.* hebben het feromoon dat verantwoordelijk is voor de seksuele voortplanting van *S. robusta* geïdentificeerd als *L*-diproline, maar de structuur van de receptor waarmee dit feromoon interageert, is nog onbekend.²¹ De interesse in en het belang van diatomeeën is groot omwille van de gevarieerde toepassingen, zowel van diatomeeënaarde als van levende cellen. Diatomeeënaarde wordt onder andere gebruikt als filtermateriaal, abrasief middel en als insecticide. De levende cellen kennen voornamelijk toepassingen in de biotechnologie, zoals voor de productie van biodiesel, vitaminen, essentiële onverzadigde vetzuren en aminozuren. Bovendien worden ze ook gebruikt als voeder in de aquacultuur.

Het feromoon dat verantwoordelijk is voor de seksuele voortplanting van *S. robusta*, *L*-diproline, is een voorbeeld van een diketopiperazine, wat behoort tot de klasse van cyclische peptiden die wijdverspreid voorkomen in de natuur. In de natuur zijn twee mogelijke *pathways* voor de biologische synthese van diketopiperazinen gekend, namelijk met behulp van cyclodipeptidesynthases of met niet-ribosomale peptidessynthetases. Echter, voor de synthese van het diketopiperazine *L*-diproline is nog geen bewijs gevonden dat de synthese via één van deze *pathways* plaatsvindt. Wel is geweten dat de synthese van *L*-proline start vanuit *L*-glutamaat en wordt gekatalyseerd door het bifunctioneel enzym Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaatsynthetase en door Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaatreductase. In het onderzoek naar de syntheseroute van *L*-diproline in *S. robusta* werd een enzym geïdentificeerd dat mogelijk verantwoordelijk is voor de activatie van de *L*-diprolineproductie, namelijk een bifunctioneel esterase dat bestaat uit een guanylaatcyclase en een cyclisch nucleotide fosfodiesterase. Dit esterase is verantwoordelijk voor de productie en afbraak van cyclisch guanosinemonofosfaat, maar de exacte rol van deze molecule is nog niet uitgeklaard.

Hieruit volgt dat zowel over de enzymen die verantwoordelijk zijn voor de synthese van het feromoon als over de receptor waarmee het feromoon interageert, nog niet veel is gekend. Door de uitvoering van een structuur-activiteitsrelatie-studie met *L*-diproline-analogen was het de bedoeling om over dit laatste meer informatie te verkrijgen.

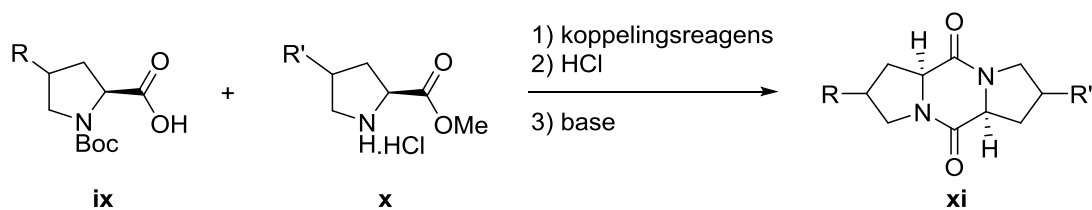
In het eerste luik van deze thesis werden analogen van het feromoon *L*-diproline chemisch gesynthetiseerd. Daarvoor werden eerst *L*-proline-analogen gesynthetiseerd die later gebruikt werden als bouwstenen voor de synthese van de *L*-diproline-analogen. De verschillende syntheses

startten vanuit dezelfde bouwsteen, namelijk *trans*-4-hydroxy-*L*-proline **i** (Schema 31). Voor de synthese van het oxoproline-analoog **iii** werden achtereenvolgens een *N*-Boc-bescherming en oxidatie uitgevoerd. Voor de synthese van *trans*-4-azido-*L*-proline **vii** en *cis*-4-hydroxy-*L*-proline **viii** werd, na een verestering van **i** en een *N*-Boc-bescherming van **iv**, een Walden-inversie uitgevoerd met omkering van de stereochemie tot gevolg (**vi**). Ten slotte werd **vi** *N*-Boc-ontschermd met de vorming van het hydroxyproline-analoog **viii**. Voor de synthese van **vii** werd de hydroxylgroep omgezet tot een goede *leaving* groep, zodat een azide een nucleofiele substitutie kon uitvoeren, wat na Boc-ontscherming het azidoproline-analoog **vii** opleverde.



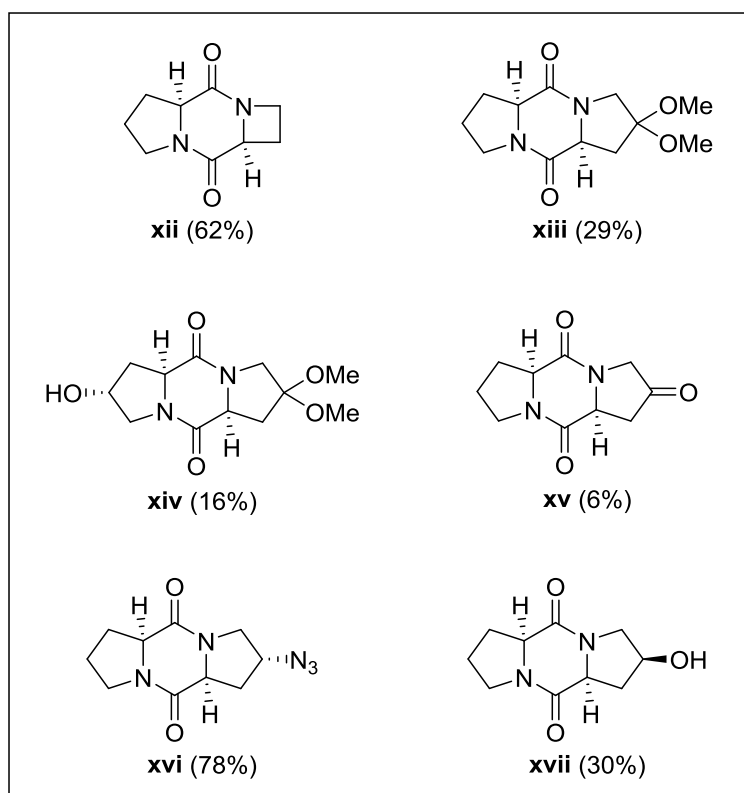
Schema 31: Overzicht van de synthese van de *L*-proline-analogen

De gesynthetiseerde *L*-proline-analogen werden dan samen met commercieel beschikbare analogen gekoppeld tot *L*-diproline-analogen. Ondanks de ogenschijnlijk eenvoudige driestaps synthesemethode, verliep de synthese van de verschillende *L*-diproline-analogen niet altijd zoals gewenst (Schema 32). Twee *L*-proline-analogen, waarvan één analoog *N*-Boc-beschermde was (**ix**) en één voorkwam als methylester (**x**), werden gekoppeld waarna de *N*-Boc-beschermende groep werd afgesplitst. Ten slotte vond de ringsluiting plaats met vorming van het *L*-diproline-analoog **xi**. Door verschillen in reactiviteit en polariteit van de verschillende analogen kwamen een aantal problemen bij de synthese tot uiting.



Schema 32: Algemene procedure voor de synthese van de L-diproline-analogen

Zo leidde de synthese van het oxo-analoog **xv** tot de vorming van een dimethoxyacetaal **xiii** door de uitvoering van de Boc-ontscherming in MeOH. Daardoor moest er overgeschakeld worden op een andere methode en werd TFA gebruikt voor de Boc-ontscherming. Dit leverde uiteindelijk wel analoog **xv** op, maar door een beperkte omzetting bij de ringsluiting, werd een rendement van slechts 6% bekomen. Bij *cis*-hydroxy-L-diproline **xvii** zorgden voornamelijk problemen bij de opzuivering voor het lage rendement (30%). De syntheses van het azetidine- **xii** en azido-analoog **xvi** verliepen zonder problemen en resulteerden in rendementen van respectievelijk 62% en 78%. Uiteindelijk werden zes verschillende analogen gesynthetiseerd, waarvan vier (**xii**, **xiii**, **xvi** en **xvii**) op hun biologische activiteit werden getest (Figuur 20).



Figuur 20: Gesynthetiseerde L-diproline-analogen

In het tweede luik van deze masterthesis werd in biologische testen het vermogen van de gesynthetiseerde analogen om met de feromoonreceptor te interageren, onderzocht. Dit werd met zowel attractie- als inhibitie-assays nagegaan. Bij het eerste type werden aan een medium met diatomeeën *beads* toegevoegd die gecoat waren met een *L*-diproline-analoog en werd de attractie van de cellen naar de *beads* gemeten. In het tweede type test werd een *L*-diproline-analoog aan een medium met diatomeeën toegevoegd. Vervolgens werden *beads* gecoat met het feromoon bijgevoegd, waarna de attractie van de cellen naar de *beads* geanalyseerd werd. Indien het analoog in staat is om te interageren met de feromoonreceptor, wordt de attractie naar de *beads* geïnhibeerd aangezien de cellen verward geraken en niet meer door de *beads* aangetrokken worden.

Analogen **xii**, **xiii**, **xvi** en **xvii** werden getest op hun biologische activiteit in zowel attractie- als inhibitie-assays. Bij de attractie-assays werden de diatomeeën niet aangetrokken door *beads* gecoat met analogen **xii**, **xiii** als **xvii**, terwijl dit voor analoog **xvi** wel het geval was. *Beads* gecoat met analoog **xvi** induceerden een even grote attractie als feromoon-gecoate *beads*. Dit wil echter niet zeggen dat enkel dit laatste analoog in staat is om een feromooneffect uit te oefenen. Door de polariteit van de andere analogen is het mogelijk dat ze niet coaten op de *beads* waardoor geen attractie werd waargenomen.

In de inhibitie-assays werden de analogen getest in drie concentraties, namelijk 10 nM, 100 nM en 10 µM. Alle analogen (**xii**, **xiii**, **xvi** en **xvii**) vertoonden een duidelijke inhibitie bij de hoogste concentratie, wat aantoont dat, ondanks de aanwezigheid van substituenten op het *L*-diprolineskelet of aanpassingen aan de ringstructuur, de analogen nog altijd in staat zijn om te interageren met de receptor. Enkel analoog **xvi** kon ook bij de laagste concentratie inhibitie veroorzaken. Of dit effectief op een feromooneffect wijst, moet nog verder onderzocht worden aangezien hier ook sprake zou kunnen zijn van een toxisch effect of van receptorblokkering door de analogen. Hierbij moet echter de opmerking gemaakt worden dat analogen **xiii**, **xvi** en **xvii** slechts in twee herhalingen werden getest en dat minstens drie herhalingen noodzakelijk zijn voor een statistisch betrouwbaar resultaat.

4.2 Besluit

Aan de hand van de resultaten bekomen bij de chemische synthese van de zes *L*-diproline-analogen en de biologische evaluatie van vier ervan, kunnen een aantal besluiten getrokken worden. De algemene synthesesmethode die werd gehanteerd voor de synthese van de *L*-diproline-analogen, bleek een robuuste koppelingsmethode. Naast een aantal kleine aanpassingen, was het mogelijk om elk analoog volgens het driestapsmechanisme te synthetiseren.

Op basis van de resultaten bekomen bij de attractie-assays konden, op één analoog na, geen besluiten getrokken worden, aangezien deze verbindingen door hun polariteit mogelijk slechts beperkt coatbaar zijn. Daarom is het interessant dat hiernaast ook inhibitie-assays werden uitgevoerd. Op basis van deze assays bleken de analogen bij hoge concentraties een gelijkaardig inhiberend effect te vertonen als het feromoon, maar bij lage concentraties konden verschillen in inhibitie opgemerkt worden. Verder onderzoek moet uitgevoerd worden om na te gaan of het inhiberend effect kan toegeschreven worden aan een feromooneffect of dat het eerder te wijten is aan toxiciteit van de verbinding of aan de blokkering van de receptor.

Als blijkt dat het inhiberend effect overeenkomt met een feromooneffect, dan kunnen nieuwe analogen voorgesteld worden, door enerzijds variaties in de functionele groepen of anderzijds door aanpassingen in de ringstructuur van *L*-diproline. De testen dragen bij tot het uiteindelijke doel, namelijk de synthese van een probe waarmee de feromoonreceptoren in de cel kunnen opgespoord worden.

Hoofdstuk 5

Experimenteel deel

5.1 Analysemethoden

5.1.1 Dunnelaagchromatografie (TLC)

Dunnelaagchromatografie werd toegepast om ruwe reactiemengsels te analyseren en R_f -waarden te bepalen. Deze techniek werd voornamelijk aangewend om een geschikt eluens voor kolomchromatografie te bepalen. Hiervoor werd gebruik gemaakt van silicaplaatjes (Merck Silicagel 60 F₂₅₄; precoated; 0,25 mm). Visualisatie van oxideerbare verbindingen gebeurde met KMnO_4 of I_2 in een gesloten glazen recipiënt, terwijl voor de visualisatie van aminozuren ninhydrine werd gebruikt.

5.1.2 Kolomchromatografie

Voor de preparatieve opzuivering van reactiemengsels en verbindingen werd kolomchromatografie toegepast. Als stationaire fase werd hiervoor silicagel gebruikt (Silicagel for flash chromatography, Merck; korreldiameter: 35-70 μm ; poriediameter: ca. 6 nm) en het geschikte eluens werd bepaald aan de hand van dunnelaagchromatografie. De diameter van de gebruikte glazen kolom was afhankelijk van de hoeveelheid op te zuiveren product. Voor de elutie van de op te zuiveren componenten werd een uitloopsnelheid van 5 cm per minuut aangewend.

5.1.3 Automatische kolomchromatografie

Voor de opzuivering van polaire verbindingen werd *reversed phase* automatische kolomchromatografie uitgevoerd door middel van een Grace Reveleris™ Flash Chromatography systeem. *Reversed phase* kolommen (C18; korreldiameter: 0,020-0,040 μm) werden gebruikt om de scheiding te verwezenlijken, waarbij het type kolom (4 g – 120 g) afhankelijk was van de hoeveelheid op te zuiveren product. De uitloopsnelheid was afhankelijk van het type kolom en varieerde van 15 mL/min tot 80 mL/min. Detectie van de verbindingen gebeurde aan de hand van twee UV-detectoren.

5.1.4 Vloeistofchromatografie-massaspectroscopie (LC-MS)

Vloeistofchromatografie-massaspectroscopie (LC-MS) werd uitgevoerd aan de hand van een Agilent 1200 series LC-MSD SL-toestel dat uitgerust was met een UV-detector. Voor de vloeistofchromatografie was een Supelco Ascentis Express C18 kolom (3 cm x 4,6 mm; 2,7 μm fused core particles; poriegrootte: 90 Å) geïnstalleerd met als mobiele fase een mengsel van

acetonitril, methanol en/of water, afhankelijk van de geselecteerde methode. Deze kolom was gekoppeld aan een Agilent 1100 Series MS massaspectrometer met elektro-spray-ionisatiegeometrie (ESI; 4000 V; 70 eV) en een quadropoldetector.

5.1.5 Automatische preparatieve HPLC

Verbindingen die werden gebruikt in de biologische testen werden opgezuiverd met automatische preparatieve HPLC. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een Agilent 1100 Series toestel met UV-detector, uitgerust met een Zorbax Eclipse XDB-C18 kolom (150 mm x 21,2 mm; partikelgrootte: 5 μm).

5.1.6 NMR-spectroscopie

^1H NMR- en ^{13}C NMR-spectra werden opgenomen van zowel reactiemengsels als zuivere producten en hiervoor werd gebruik gemaakt van een Bruker Avance Nanobay III NMR-spectrometer (respectievelijk 400 MHz en 100,6 MHz) en een 5 mm BBFO Z-gradiënt high resolution probe. De verbindingen werden voornamelijk opgelost in gedeutereerd chloroform (CDCl_3) met tetramethylsilaan (TMS) als interne standaard, maar ook gedeutereerde methanol (methanol- d_4), gedeutereerd water (D_2O) en gedeutereerde aceton (aceton- d_6) werden aangewend als solventen. De chemische verschuivingen werden gerapporteerd als een δ -waarde in ppm. Voor de karakterisatie van verbindingen werden ook COSY-, HSQC-, en HMBC-spectra opgenomen zodat alle productsignalen konden toegewezen worden.

5.1.7 Massaspectrometrie (MS)

Massaspectra (lage resolutie) werden opgenomen met een Agilent 1100 MSD SL series massaspectrometer met electro-spray-ionisatiegeometrie (ESI; 4000 V; 70 eV) en een quadropoldetector.

5.1.8 Infraroodspectroscopie

Infraroodspectra werden opgenomen met een IRAffinity_1S, Fourier Transform Infrared Spectrophotometer van Shimadzu. Zowel de spectra van vloeibare verbindingen als van vaste stoffen konden bepaald worden door het aanbrengen van de verbinding op een optisch element, waarna met behulp van LabSolutions IR Software een infraroodspectrum werd verkregen.

5.1.9 Smeltpuntbepaling

Smeltpunten van kristallijne stoffen werden bepaalde met behulp van een Kofler-smeltpuntbank, type WME Heizbank van Wagner en Munz. Over de smeltpuntbank heerst een temperatuurgradiënt van 50 tot 260 $^{\circ}\text{C}$. Een kleine hoeveelheid van de vaste verbinding werd aangebracht op de koude zijde van de smeltpuntbank en langzaam naar de warme zijde verschoven, totdat de verbinding smolt.

5.1.10 Automatische balans

Voor het afwegen van massa's tot 0,1 µg werd gebruik gemaakt van een Perkin Elmer AD-6 Autobalance Controller. Voor elk gebruik werd de balans gekalibreerd met een gewichtje van 100 mg. Vervolgens werd het product aangebracht op één van de weegschalen van de balans en werd het verschil tussen de twee weegschalen bepaald.

5.1.11 Lichtmicroscop

De foto-opname bij de biologische testen gebeurde door middel van een geïnverteerde Zeiss lichtmicroscop die verbonden werd met een Nikon DS-Fi2 CCD camera. Met behulp van de NIS Elements Imaging Software konden de gewenste beelden opgeslagen worden.

5.2 Droge solventen

Een aantal chemische reacties werden uitgevoerd onder droge omstandigheden om ongewenste nevenreacties te vermijden. Voor reacties waarbij droge dichloormethaan, tetrahydrofuraan of acetonitril benodigd waren, werden de solventen van het MBraun SPS-800 solvent zuiveringssysteem gebruikt. De solventen worden gestockeerd in Pure-Pac containers (volume: 17 L) in een veiligheidskast. Ze worden via stikstof onder druk gezet en vervolgens door twee filter/droogkolommen gestuurd. Deze kolommen bestaan uit stainless steel (1.4301/ US 304) met een intern volume van 4,8 L, waarbij het packmateriaal (moleculaire zeven) afhankelijk is van het gewenste solvent. Tetrahydrofuraan wordt nog extra gedroogd door een extra filter vooraleer het in contact wordt gebracht met de droogkolommen. Vooraleer de gedroogde solventen worden opgevangen in kolven onder inerte atmosfeer, wordt een vacuüm atmosfeer gecreeërd met behulp van een membraanpomp (type MPC 301 Zp).

In reacties waarbij droge dimethylformamide, droge ethylacetaat of droge methanol als solvent werden gebruikt, werden deze solventen gedroogd over moleculaire zeven.

5.3 Veiligheid

5.3.1 Algemene veiligheidsaspecten

Vooraleer kon gestart worden met de masterthesis werden de interne richtlijnen en veiligheidsinstructies die gelden in de SynBioC Research Group meegedeeld, zodat alle experimenten tijdens deze masterthesis in het kader van veiligheid en gezondheid uitgevoerd werden. Dit houdt in dat zowel de kledingvoorschriften nageleefd moesten worden als dat er bewust omgegaan moest worden met de reagentia en apparatuur die werden gebruikt in het labo. Alvorens een experiment te starten was het dan ook belangrijk om de *Material Safety Data Sheet* (MSDS) fiches van de reagentia te raadplegen en speciale zorg te besteden bij het gebruik van

risicohoudende reagentia en apparatuur. Dit om het persoonlijk risico als dat van de omstaanders te minimaliseren.

5.3.2 Specifieke veiligheidsrisico's

Zoals eerder vermeld werden de veiligheidsrisico's in acht genomen bij de uitvoering van het experimenteel werk. Hiervoor werden de MSDS-fiches geraadpleegd waarin de risico's van de producten en de richtlijnen voor veilig gebruik vermeld worden. In Tabel 1 worden de belangrijkste risicovolle producten die gehanteerd werden, weergegeven met hun fysische, gezondheids- en/of milieugevaren.

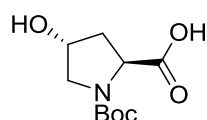
Tabel 1: Risicovolle producten

Product	Gevaar
Trifluorazijnzuur (TFA)	Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel, schadelijk bij inademing
Dimethylformamide (DMF)	Oogirritatie, schadelijk bij contact met de huid of bij inademing
Di(<i>tert</i> -butyl)dicarbonaat (Boc ₂ O)	Oogirritatie, huidirritatie, schadelijk bij inademing
Tetrahydrofuraan (THF)	Licht ontvlambaar, oogirritatie, irritatie van de luchtwegen, kankerverwekkend
n-Hexaan	Licht ontvlambaar, huidirritatie bij langdurige blootstelling, irritatie van de luchtwegen
<i>N,N</i> -diisopropylethylamine (DIPEA)	Licht ontvlambaar, veroorzaakt ernstige brandwonden en oogschade, irritatie van de luchtwegen
<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl)	Huidirritatie, oogirritatie, irritatie van de luchtwegen, kankerverwekkend

5.4 Synthesemethoden en karakterisaties

5.4.1 Synthese van de *L*-proline-analogen

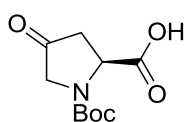
5.4.1.1 Synthese van *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline **51**



De synthese van *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline **51** wordt in de literatuur beschreven door Keller *et al.*⁸⁶ Startende van *trans*-4-hydroxy-*L*-proline **50** leverde dit *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline **51** op als een transparante olie met

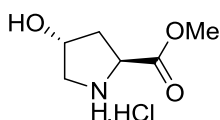
een rendement van 86%.

5.4.1.2 Synthese van *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54**



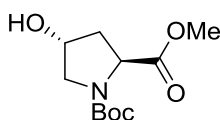
In een gevlamdroogde kolf van 250 mL werd een oplossing gemaakt van 15,64 g *N*-Boc-4-hydroxy-*L*-proline **51** (67,66 mmol; 1 equiv) in 150 mL droge EtOAc. Hieraan werd 11,8 g TCC (50,785 mmol; 0,75 equiv) toegevoegd, waarna de oplossing gekoeld werd tot 0 °C onder argon. In een gevlamdroogde kolf van 50 mL werd een oplossing gemaakt van 5,28 g TEMPO (33,79 mmol; 0,5 equiv) in 15 mL EtOAc. Deze oplossing werd toegevoegd aan de hydroxyprolineoplossing wat resulteerde in een oranje reactiemengsel. Dit werd gedurende 30 minuten geroerd bij -10 tot -5 °C onder argon. Na afloop werd de reactie gequencht met 30 mL pekel, waarna het reactiemengsel gefilterd werd over celiet. Het gevormde HOCl werd in vacuüm verwijderd. Vervolgens werd het reactiemengsel twee maal geëxtraheerd met 20 mL EtOAc, waarna de organische fractie twee maal gewassen werd met 20 mL pekel. Na het drogen van de organische fractie met MgSO₄ werd het solvent in vacuüm ingedampt. Het product werd gekristalliseerd door toevoegen van 15 mL *n*-hexaan en 4 mL EtOAc en resulteerde in oranje kristallen. Deze kristallen werden opgezuiverd via omkristalliatie in EtOAc. Dit leverde donkergrijze kristallen (**54**) op met een rendement van 42%.

5.4.1.3 Synthese van *trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester.HCl **61**



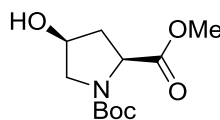
Vanuit *trans*-4-hydroxy-*L*-proline **50** werd het methylester **61** gesynthetiseerd, volgens de synthese beschreven door *Gauchot et al.*⁹⁵ Dit leverde witte kristallen op met een rendement van 93%.

5.4.1.4 Synthese van *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **62**



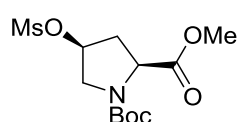
De synthese van *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **62** vanuit *trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester.HCl **61** wordt in de literatuur beschreven door *Ikubo et al.*⁹⁶ Het gevormd product werd opgezuiverd met kolomchromatografie (KMnO₄, PE/EtOAc 1/3, R_f = 0,21) en leverde een lichtgele olie op met een rendement van 86%.

5.4.1.5 Synthese van *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **63**



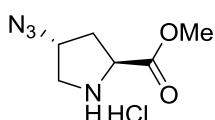
De Walden inversie werd uitgevoerd zoals beschreven in de literatuur, startend vanuit *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **62** in drie stappen.⁹⁶ In de eerste stap werd *N*-Boc-*trans*-4-((methylsulfonyl)oxy)-*L*-proline methylester gevormd vanuit *N*-Boc-*trans*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **62**. Dit resulteerde in een lichtbruine olie die spontaan uitkristalliseerde met een rendement van 82%. Vervolgens werd *N*-Boc-*trans*-4-((methylsulfonyl)oxy)-*L*-proline methylester omgezet tot *N*-Boc-*cis*-4-((benzoyl)oxy)-*L*-proline methylester. Dit leverde een lichtbruine olie op die spontaan uitkristalliseerde met een rendement van 91%. Ten slotte werd *N*-Boc-*cis*-4-((benzoyl)oxy)-*L*-proline methylester omgezet tot *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **63**.⁹⁶ Het product werd opgezuiverd met kolomchromatografie (KMnO₄, *n*-hexaan/EtOAc 1/3, R_f = 0,21) en leverde een lichtbruine olie op die spontaan uitkristalliseerde met een rendement van 68%.

5.4.1.6 Synthese van *N*-Boc-*cis*-4-((methylsulfonyl)oxy)-*L*-proline methylester **64**



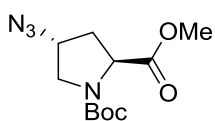
N-Boc-*cis*-4-((methylsulfonyl)oxy)-*L*-proline methylester **64** werd gesynthetiseerd uit *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **63** zoals beschreven door *Ikubo et al.*⁹⁶ Dit resulteerde in een lichtgele olie die spontaan uitkristalliseerde met een rendement van 94%.

5.4.1.7 Synthese van *N*-Boc-*trans*-4-azido-*L*-proline methylester **65**



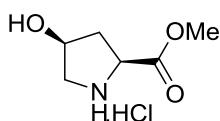
N-Boc-*cis*-4-((methylsulfonyl)oxy)-*L*-proline methylester **64** werd omgezet tot *N*-Boc-*trans*-4-azido-*L*-proline methylester **65**, wat een laag-visceuze lichtbruine olie opleverde met een rendement van 92%.⁹⁶

5.4.1.8 Synthese van *trans*-4-azido-*L*-proline methylester.HCl **66**



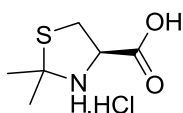
De Boc-ontscherming van *N*-Boc-*trans*-4-azido-*L*-proline methylester **65** verliep zoals beschreven in de literatuur met vorming van *trans*-4-azido-*L*-proline methylester.HCl **66**.³² Dit resulteerde in een lichtbruine olie met een kwantitatief rendement.

5.4.1.9 Synthese van *cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester.HCl **67**



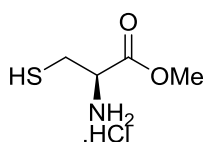
De Boc-ontscherming van *N*-Boc-*cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester **63** resulteerde in de vorming van *cis*-4-hydroxy-*L*-proline methylester.HCl **66**.³² Dit leverde witte kristallen op met een kwantitatief rendement.

5.4.1.10 Synthese van het HCl zout van *L*-2,2-dimethylthiazolidine-4-carbonzuur **70**



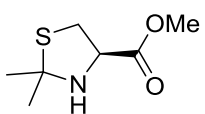
In een kolf van 250 mL werden 1,02 g *L*-cysteïne **68** (8,25 mmol; 1 equiv) en 0,25 mL HCl (8,25 mmol; 1 equiv) samengevoegd. Hieraan werden 14,3 mL 2,2-dimethoxypropan en 70 mL aceton toegevoegd en dit werd gedurende één uur gekookt onder reflux. De gevormde witte kristallen werden in twee worpen afgefiltreerd met een rendement van 65%.⁹⁹

5.4.1.11 Synthese van *L*-cysteïne methylester.HCl **75**



L-cysteïne **68** werd omgezet tot *L*-cysteïne methylester.HCl **75** zoals beschreven door *Tan et al.*¹⁰¹ Dit resulteerde in witte kristallen met een rendement van 87%.

5.4.1.12 Synthese van *L*-methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat **76**



L-methyl-2,2-dimethylthiazolidine-4-carboxylaat **76** werd gesynthetiseerd uit *L*-cysteïne methylester.HCl **75**.¹⁰⁰ Dit leverde een laag-visceuze gele olie met een rendement van 70%.

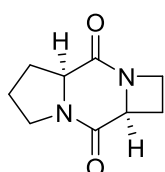
5.4.2 Synthese van de *L*-diproline-analogen

Aangezien de synthese van de analogen **2**, **5**, **6**, **83** en **85** gebaseerd is op eenzelfde strategie, wordt de synthese éénmaal in detail beschreven voor **2**. Met een superscript wordt aangegeven waar er verschillen voor de verschillende analogen zijn en die worden per analoog gespecificeerd.

5.4.2.1 Synthese van (*4aS,9aS*)-hexahydro-4*H*-azeto[1,2-*a*]pyrrolo[1,2-*d*]pyrazine-4,9(2*H*)-dion **2**

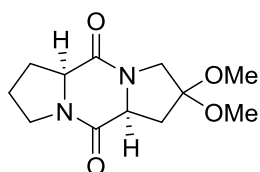
In een gevlamdroogde kolf van 250 mL werden 1,04 g *N*-Boc-*L*-azetidine-2-carbonzuur **81** (4,65 mmol; 1 equiv) en 0,91 g *L*-proline methylester.HCl **82** (5,52 mmol; 1,1 equiv) opgelost in 70 mL droge DMF. Hieraan werden vervolgens 0,79 g Oxyma Pure (5,56 mmol; 1,2 equiv), 1,07 g EDC.HCl (5,58 mmol; 1,2 equiv) en 1,97 mL DIPEA (11,63 mmol; 2,5 equiv) toegevoegd. Dit werd overnacht geroerd bij kamertemperatuur onder argon. Als de reactie afgelopen was, werd DMF in vacuüm verwijderd. Het product werd opgezuiverd met kolomchromatografie^a met als eluens *i*PrOH/EtOAc (1/9), visualisatie met KMnO₄. Vervolgens werd het product opgelost in 100 mL droge MeOH onder argon. Dit werd gekoeld in een ijsbad, waarna 1,33 mL AcCl^b (18,60 mmol; 4 equiv) traag aan de oplossing werd toegedruppeld. Na het toevoegen, werd het reactiemengsel terug bij kamertemperatuur gebracht en reageerde het overnacht^c. Na het aflopen van de reactie werd het solvent en de resterende hoeveelheid HCl in vacuüm ingedampt. Hierna werd het product opnieuw opgelost in 40 mL droge DMF onder argon. Hieraan werd 1,68 mL piperidine toegevoegd (16,98 mmol; 3 equiv) en dit reageerde voor 1 uur. Na reactie werd het solvent in vacuüm verwijderd. Om de verbinding op te zuiveren werd kolomchromatografie^d toegepast met als eluens *i*PrOH/ACN (1/9), visualisatie met I₂.

(*4aS,9aS*)-hexahydro-4*H*-azeto[1,2-*a*]pyrrolo[1,2-*d*]pyrazine-4,9(2*H*)-dion **2**



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,85-1,94 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 1,96-2,06 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 2,18-2,33 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH); 2,61-2,74 (2H, m, CHCH₂CH₂N); 3,50-3,63 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH); 4,04 (2H, q, *J* = 8,7 Hz, CHCH₂CH₂N); 4,08 (1H, d, *J* = 10,0 Hz, CH₂CH₂CH₂CH); 4,93 (1H, t, *J* = 8,0 Hz, CHCH₂CH₂N). **¹³C NMR** (100 MHz, ref = CDCl₃): δ 22,7 (CHCH₂CH₂N); 23,2 (CH₂CH₂CH₂); 26,9 (CH₂CH₂CH₂CH); 45,6 (CH₂CH₂CH₂CH); 47,6 (CHCH₂CH₂N); 59,0 (CH₂CH₂CH₂CH); 63,0 (CHCH₂CH₂N); 167,3 (C_{quat}OCHCH₂CH₂N); 169,0 (CH₂CH₂CH₂CHC_{quat}O). **IR** (ATR, cm⁻¹): ν_{C=O} = 1667, 1639; ν_{max} = 2889, 1449, 1402, 1339, 1304, 1227, 665, 623. **MS** (70 eV): *m/z* (%) 181 (M + H⁺, 100). Witte kristallen. T_m = 174 °C. R_f = 0,28 (ACN/*i*PrOH 90/10). Rendement 62%.

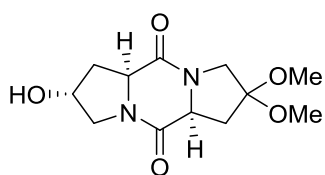
5.4.2.2 Synthese van (*5aS,10aS*)-2,2-dimethoxyoctahydro-5*H*,10*H*-dipyrrolo[1,2-*a*:1',2'-*d*]pyrazine-5,10-dion **83**



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,86-1,98 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 2,02-2,08 (1H, m, CH₂(HCH)CH); 2,14-2,24 (1H, m, CH₂(HCH)CH); 2,28-2,35 (1H, m, CH₂(HCH)CH); 2,36-2,39 (1H, m, CH(HCH)C(OCH₃)₂); 2,54 (1H, d x d x d, *J* = 13,1; 7,4; 1,0 Hz, CH(HCH)C(OCH₃)₂); 3,29 (6H, s, 2 x OCH₃); 3,56-

3,59 (3H, m, CH₂CH₂N en N(HCH)C(OCH₃)₂); 3,69 (1H, d, *J* = 12,2 Hz, N(HCH)C(OCH₃)₂); 4,16 (1H, t, *J* = 8,0 Hz, CH₂CH₂CH); 4,36 (1H, t, *J* = 8,5 Hz, CHCH₂C(OCH₃)₂). ¹³C NMR (100 MHz, ref = CDCl₃): δ 23,2 (CH₂CH₂CH₂); 27,7 (CH₂CH₂CH); 35,3 (CHCH₂C(OCH₃)₂); 45,4 (CH₂CH₂N); 49,3 (OCH₃); 50,6 (OCH₃); 51,3 (NCH₂C(OCH₃)₂); 59,0 (CHCH₂C(OCH₃)₂); 60,0 (CH₂CH₂CH); 106,2 (C_{quat}(OCH₃)₂); 165,8 (C_{quat}OCHCH₂C(OCH₃)₂); 166,6 (CH₂CH₂CHC_{quat}O). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{C=O} = 1661; ν_{max} = 1429, 1126, 1101, 1069, 870, 642, 623, 559, 420. MS (70 eV): m/z (%) 255 (M + H⁺, 0); 224 (M + H⁺ - OMe, 14); 223 (M - OMe, 100). Donkerbruine olie. Na prep: lichtgele kristallen. T_{m, na prep} = 195 °C. R_f = 0,27 (ACN/iPrOH 90/10). Rendement 29%.

5.4.2.3 Synthese van (5aS,7R,10aS)-7-hydroxy-2,2-dimethoxyoctahydro-5H,10H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine-5,10-dion 85

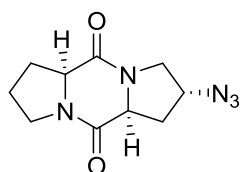


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2,17-2,28 (1H, m, HOCH(HCH)CH); 2,35-2,37 (1H, m, (HCH)C(OCH₃)₂); 2,38-2,40 (1H, m, HOCH(HCH)CH); 2,52 (1H, d x d x d, *J* = 13,1; 7,5; 1,0 Hz, (HCH)C(OCH₃)₂); 3,27 (6H, s, 2 x OCH₃); 3,56-3,60 (2H, m, NCH₂C(OCH₃)₂); 3,65-3,72 (2H, m, HOCHCH₂N); 4,39 (1H, t, *J* = 8,4 Hz, CHCH₂C(OCH₃)₂); 4,51 (1H, d x d, *J* = 10,4; 6,7 Hz, HOCHCH₂CH); 4,62 (1H, br s, HOCH). ¹³C NMR (100 MHz, ref = CDCl₃): δ 35,2 (CH₂C(OCH₃)₂); 37,1 (HOCHCH₂CH); 49,4 (OCH₃); 50,5 (OCH₃); 51,3 (NCH₂C(OCH₃)₂); 54,0 (HOCHCH₂N); 58,3 (HOCHCH₂CH); 59,0 (CHCH₂C(OCH₃)₂); 69,0 (HOCH); 106,1 (C_{quat}(OCH₃)₂); 165,8 (C_{quat}OCHCH₂C(OCH₃)₂); 166,7 (HOCHCH₂CHC_{quat}O). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{OH} = 3399; ν_{C=O} = 1643; ν_{max} = 1429, 1219, 1128, 1096, 1040, 635, 602, 561. MS (70 eV): m/z (%) 271 (M + H⁺, 0); 240 (M + H⁺ - OMe, 13); 239 (M - OMe, 100). Lichtbruine olie. R_f = 0,23 (ACN/iPrOH 90/10). Rendement 16%.

5.4.2.4 Synthese van (2R,5aS,10aS)-2-azidooctahydro-5H,10H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine-5,10-dion 5

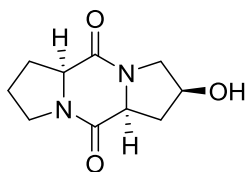
^a Kolomchromatografie (KMnO₄, PE/EtOAc 1/9)

^d Automatische kolomchromatografie, *reversed phase* (H₂O/ACN 90/10-0/100)



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,88-1,98 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 2,00-2,08 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 2,14-2,24 (1H, m, CH₂(HCH)CH); 2,28-2,38 (2H, m, CH₂(HCH)CH en CH(HCH)CHN₃); 2,44 (1H, t x d x d, *J* = 13,9; 5,9; 1,5 Hz, CH(HCH)CHN₃); 3,55 (2H, d x d, *J* = 8,5; 5,5 Hz, CH₂CH₂N); 3,61 (1H, d, *J* = 13,0 Hz, N(HCH)CHN₃); 3,72 (1H, d x d, *J* = 13,0; 5,9 Hz, N(HCH)CHN₃); 4,22 (1H, t, *J* = 8,1 Hz, CH₂CH₂CH); 4,35 (1H, t, *J* = 5,0 Hz, CHN₃); 4,42 (1H, d x d, *J* = 10,2; 5,9 Hz, CHCH₂CHN₃). ¹³C NMR (100 MHz, ref = CDCl₃): δ 23,4 (CH₂CH₂CH₂); 27,6 (CH₂CH₂CH); 34,0 (CHCH₂CHN₃); 45,3 (CH₂CH₂N); 50,7 (NCH₂CHN₃); 58,7 (CHN₃); 58,8 (CHCH₂CHN₃); 60,5 (CH₂CH₂CH); 165,7 (C_{quat}OCHCH₂CHN₃); 166,3 (CH₂CH₂CHC_{quat}O). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{C=O} = 1657; ν_{max} = 2886, 2099, 1431, 1327, 1271, 1165, 731, 642, 615. MS (70 eV): m/z (%) 236 (M + H⁺, 100). Lichtgele kristallen. Na prep: witte kristallen. T_m = 168,6 °C. Rendement 78%.

5.4.2.5 Synthese van (2S,5aS,10aS)-2-hydroxyoctahydro-5H,10H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine-5,10-dion 6



^a Automatische kolomchromatografie, *reversed phase* (H₂O/MeOH 80/20-40/60)

^b Er werden 5 equiv AcCl aan het reactiemengsel toegevoegd.

^c 48 uur reactie

^d Automatische kolomchromatografie, *reversed phase* (H₂O/MeOH 98/2-0/100)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,87-1,99 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 2,01-2,10 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 2,22-2,38 (2H, m, CH₂CH₂CH); 2,42 (1H, d x d x d, *J* = 14,0; 9,2; 4,8 Hz, CH(HCH)CHOH); 2,64 (1H, d x d x d x d, *J* = 14,0; 4,8; 3,5; 1,8 Hz, CH(HCH)CHOH); 3,43 (1H, d x d, *J* = 12,3; 4,6 Hz, N(HCH)CHOH); 3,57 (2H, d x d, *J* = 8,4; 5,4 Hz, NCH₂CH₂CH₂); 3,83 (1H, d x d x d, *J* = 12,3; 2,0; 1,8 Hz, N(HCH)CHOH); 4,20 (1H, t, *J* = 8,2 Hz, CH₂CH₂CH); 4,27 (1H, d x d, *J* = 9,2; 4,9 Hz, CHCH₂CHOH); 4,52 (1H, m, CHOH). ¹³C NMR (100 MHz, ref = CDCl₃): δ 23,4 (CH₂CH₂CH₂); 27,5 (CH₂CH₂CH); 35,6 (CHCH₂CHOH); 45,4 (NCH₂CH₂CH₂); 53,2 (NCH₂CHOH); 58,8 (CHCH₂CHOH); 60,3 (CH₂CH₂CH); 69,1 (CHOH); 166,3 (C_{quat}OCHCH₂CHOH); 167,3 (CH₂CH₂CHC_{quat}O). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{OH} = 3397; ν_{C=O} = 1643; ν_{max} = 2951, 2882, 2108, 1429, 1288, 1080, 727, 644. MS (70 eV): *m/z* (%) 211 (M + H⁺, 100). Witte kristallen. T_m = 160,6 °C. Rendement 30%.

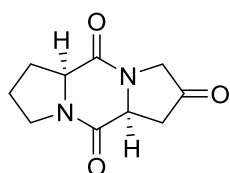
5.4.2.6 Synthese van (5aS,10aS)-hexahydro-5H,10H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine-2,5,10(3H)-trion 3

In een gevlamdroogde kolf van 250 mL werden 1,02 g *N*-Boc-4-oxo-*L*-proline **54** (4,37 mmol; 1 equiv) en 0,80 g *L*-proline methylester.HCl **82** (4,81 mmol; 1,1 equiv) opgelost in 70 mL droge DMF. Hieraan werden vervolgens 0,75 g Oxyma Pure (5,28 mmol; 1,2 equiv), 1,01 g EDC.HCl (5,28 mmol; 1,2 equiv) en 1,87 mL DIPEA (10,93 mmol; 2,5 equiv) toegevoegd. Dit werd overnacht geroerd bij kamertemperatuur onder argon. Na afloop van de reactie werd DMF in vacuüm verwijderd. Het product werd opgezuiverd met kolomchromatografie met als eluens *i*PrOH/EtOAc 1/9, visualisatie met KMnO₄. Vervolgens werd het product opgelost in 25 mL droge CH₂Cl₂ onder argon. Dit werd gekoeld in een ijsbad en 8,38 mL TFA (10,89 mmol; 40 equiv) werd hieraan toegevoegd en het reactiemengsel werd gedurende zes uur geroerd bij 0 °C. Na het aflopen van de reactie werden het solvent en resten TFA in vacuüm ingedampt met een koude trap. Hierna werd het product opnieuw opgelost in 40 mL droge DMF onder argon. Vervolgens werd 0,76 mL piperidine toegevoegd (7,74 mmol; 3 equiv) en dit reageerde voor 1 uur. Na afloop van de reactie werd het solvent in vacuüm verwijderd. Om de verbinding op te zuiveren werd kolomchromatografie toegepast met als eluens ACN, visualisatie met I₂.

Bij het indampen van TFA in combinatie met CH₂Cl₂ werd een koude trap geïnstalleerd om de vacuümpomp niet aan te tasten. Hierbij werd de vacuümdarm van de rotavapor verbonden met een koude trap die in een N₂-bad geplaatst was, en deze koude trap was zelf nog verbonden met een tweede koude trap die gekoeld werd in een waterbad. Deze tweede koude trap werd

verbonden met de vacuümpomp. Op deze manier werd TFA gecondenseerd in de koude trappen en werd aantasting van het membraan van de vacuümpomp vermeden.

(5a*S*,10a*S*)-hexahydro-5*H*,10*H*-dipyrrolo[1,2-*a*:1',2'-*d*]pyrazine-2,5,10(3*H*)-trion 3



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,90-2,00 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 2,02-2,11 (1H, m, CH₂(HCH)CH₂); 2,17-2,27 (1H, m, CH₂(HCH)CH); 2,38-2,45 (1H, m, CH₂(HCH)CH); 2,93 (1H, d x d, *J* = 19,4; 9,0 Hz, CH(HCH)CO); 3,14 (1H, d x d, *J* = 19,4; 9,0; 0,9 Hz, CH(HCH)CO); 3,61 (2H, d x d, *J* = 8,6; 5,5 Hz, CH₂CH₂N); 3,79 (1H, d, *J* = 19,7 Hz, N(HCH)CO); 4,15 (1H, d, *J* = 19,7 Hz, N(HCH)CO); 4,25 (1H, t, *J* = 8,2 Hz, CH₂CH₂CH); 4,67 (1H, t, *J* = 9,0 Hz, CHCH₂CO). **¹³C NMR** (100 MHz, ref = CDCl₃): δ 23,0 (CH₂CH₂CH₂); 27,9 (CH₂CH₂CH); 39,3 (CHCH₂CO); 45,8 (CH₂CH₂N); 52,2 (NCH₂CO); 57,5 (CHCH₂CO); 59,7 (CH₂CH₂CH); 164,6 (C_{quat}OCHCH₂CO); 166,9 (CH₂CH₂CHC_{quat}O); 206,2 (CH₂C_{quat}OCH₂). **IR** (ATR, cm⁻¹): ν_{C=O} = 1657; ν_{max} = 2886, 2099, 1431, 1327, 1271, 1165, 731, 642, 615. **MS** (70 eV): *m/z* (%) 209 (M + H⁺, 100). Oranje poeder. T_m = 199,6 °C. Rendement 6%.

5.5 Biologische testen van de gesynthetiseerde verbindingen

Aan de uitvoering van de biologische testen ging voorbereidend werk vooraf, dat bestond uit het opgroeien, het inoculeren en het conditioneren van de cellen. Dit voorbereidende werk werd uitgevoerd door E. Bonneure volgens een methode ontwikkeld in de laboratoria van de Vakgroep Biologie aan de Faculteit Wetenschappen.

85A cellen werden opgegroeid in een cultuurfles (250 mL) met Guillard's F/2 oplossing (20 mL/L). Culturen groeiden onder 12u:12u licht:donker cyclussen van wit licht (met fluorescente lampen, lichtintensiteit: 25 μmol fotonen m⁻².s⁻¹) bij 18 °C. Eens een densiteit van 3,2 ± 0,2 x 10⁸ (± se) cellen/m² bedroeg, werd de cultuur in een 4 °C klimaatkamer gebracht bij een lichtintensiteit van 3 μmol fotonen m⁻².s⁻¹.

Per well van een 24-well plaat, werd 58,9 μL medium van deze cultuur geïnoculeerd. Vervolgens werd aan de gebruikte wells 2 mL F/2 medium toegevoegd. Om bacteriële groei te vermijden, die eventueel een verstoring effect zouden kunnen hebben bij de assay, werden verschillende antibiotica toegevoegd (500 mg/L peniciline, 500 mg/L ampiciline, 100 mg/L streptomycine en 50 mg/L gentamycine). De geïnoculeerde culturen werden in een 18 °C klimaatkamer gebracht en groeiden gedurende 48 uur tot een richtdensiteit van 7 x 10⁷ cellen/m². Hierna werd het medium van de culturen vervangen door 1 mL F/2 medium en werden de cellen in het donker geplaatst gedurende 36 uur bij 18 °C.

Bij het toevoegen van SIP⁻ werd gebruikt gemaakt van gefilterd medium van stam 85B. Voor de aanmaak van dit medium werd een MT⁻ cultuur (stam 85B) die zich onder de SST bevond, opgegroeid in een 250 mL cultuurfles gedurende 1 week in een 12u:12u licht:donker cyclus. Wanneer de cultuur de late exponentiële fase van de groei bereikte, zoals bepaald aan de hand van PAM-waarden en microscopische waarnemingen, werden de cellen gefilterd zodat een steriel

medium zonder cellen werd bekomen. Van dit medium werd aan elke well 1 mL van een 1/100 verdunning toegevoegd en hierna werden de cellen geconditioneerd gedurende 8 uur bij een lichtintensiteit van 20-26 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Voor het uitvoeren van de biologische testen werden stockoplossingen van 5 mM in Milli-Q water van *L*-diproline en de verschillende gesynthetiseerde verbindingen aangemaakt, waarna, uitgaande van deze stockoplossingen, verschillende verdunningen (5 mM, 50 μM en 5 μM) aangemaakt werden in Milli-Q water. Voor de coating van de *beads* werden *hydrophilic-lipophilic balanced Oasis® beads* gebruikt. Een 1 cc kolom die 10 mg *beads* met een deeltjesgrootte van 30 μm bevat, werd eerst geconditioneerd met 1 mL MeOH en vervolgens geëquilibreerd met 2 mL Milli-Q water. Om *L*-diproline of een analoog op de *beads* te coaten, werd 2 mL van een 10 μM oplossing op de *beads* gebracht en traag door de kolom gelopen. Ten slotte werden de *beads* uit de kolom geëluëerd met 2 mL Milli-Q water. Hiervan werd een verdunning gemaakt door 20 μL *beads* toe te voegen aan 980 μL Milli-Q water.

Bij de start van de biologische test werden de oplossingen van *L*-diproline of de gesynthetiseerde verbindingen aan de well-plaat toegevoegd. Hiervoor werd van elke verdunning 4 μL toegevoegd aan een well van 2 mL om de gewenste verdunningen (10 nM, 100 nM en 10 μM) te bekomen. Om een goede menging te verkrijgen, werden de oplossingen op en neer gepipetteerd. Na vijf minuten werd ook 50 μL *beads* aan de verschillende wellen toegevoegd. Tien minuten na deze toediening kon gestart worden met de foto-opname door middel van een geïnverteerde Zeiss lichtmicroscop verbonden met een Nikon DS-Fi2 CCD camera en met behulp van NIS Elements Imaging Software. Van elke well werden acht foto's genomen, waarin de cellen die zich bij de *beads* bevonden, geanalyseerd werden met ImageJ. De verwerking van de data en de statistische analyse gebeurde met R versie 3.3.3, waarbij voor de statistische dataverwerking gebruik werd gemaakt van een *Generalized Linear Model* (GLM), gebaseerd op een Poissonverdeling. De analyses werden telkens uitgevoerd op het 5%-significantieniveau.

Hoofdstuk 6

Literatuurlijst

1. Smol, J.P. en Stoermer, E.F., *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. 2001: Cambridge University Press.
2. Round, F.E., Crawford, R.M. en Mann, D.G., *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. 2007: Cambridge University Press.
3. Armbrust, E.V., *The life of diatoms in the world's oceans*. Nature, 2009. **459**(7244): p. 185-192.
4. *Online Etymology Dictionary*. (geraadpleegd op: 10/04/2017); Beschikbaar op: http://www.etymonline.com/index.php?allowed_in_frame=0&search=diatom.
5. Adl, S.M., et al., *The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2005. **52**(5): p. 399-451.
6. Whittaker, R.H. en Margulis, L., *Protist classification and the kingdoms of organisms*. Biosystems, 1978. **10**(1-2): p. 3-18.
7. Mann, D.G. en Droop, S.J.M., *Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms*. Hydrobiologia, 1996. **336**(1): p. 19-32.
8. Hasle, G.R., et al., *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. 1996: Academic Press.
9. Koninklijk Antwerps Genootschap voor Micrografie. (geraadpleegd op: 26/04/2017); Beschikbaar op: <http://microscopie.be/galerij/diatomeeen/radielaria>.
10. *Diatom Image Database*. (geraadpleegd op: 26/04/2017); Beschikbaar op: <http://fcelter.fiu.edu/data/database/diatom/index.htm?species=3903>.
11. Snoeijs, P., Busse, S. en Potapova, M., *The importance of diatom cell size in community analysis*. Journal of Phycology, 2002. **38**(2): p. 265-281.
12. Hildebrand, M., *Diatoms, Biomineralization Processes, and Genomics*. Chemical Reviews, 2008. **108**(11): p. 4855-4874.
13. Wang, B., et al., *Coupling of carbon and silicon geochemical cycles in rivers and lakes*. Scientific Reports, 2016. **6**.
14. Werner, D., *The Biology of Diatoms*. 1977: University of California Press.
15. Gillard, J., et al., *Physiological and Transcriptomic Evidence for a Close Coupling between Chloroplast Ontogeny and Cell Cycle Progression in the Pennate Diatom *Seminavis robusta**. Plant Physiology, 2008. **148**(3): p. 1394-1411.
16. Sims, P.A., Mann, D.G. en Medlin, L., *Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data*. Phycologia, 2006. **45**(4): p. 361-402.
17. Chepurinov, V.A., et al., *In search of new tractable diatoms for experimental biology*. Bioessays, 2008. **30**(7): p. 692-702.
18. Chepurinov, V.A., et al., *Experimental Studies on Sexual Reproduction in Diatoms*, in *International Review of Cytology*. 2004, Academic Press. p. 91-154.
19. Piganeau, G., *Genomic Insights Into the Biology of Algae*. 2012: Academic Press.
20. Chepurinov, V.A., et al., *Sexual reproduction, mating system, and protoplast dynamics of *Seminavis* (Bacillariophyceae)*. Journal of Phycology, 2002. **38**(5): p. 1004-1019.
21. Gillard, J., et al., *Metabolomics Enables the Structure Elucidation of a Diatom Sex Pheromone*. Angewandte Chemie International Edition, 2013. **52**(3): p. 854-857.
22. Holden, M.T.G., et al., *Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria*. Molecular Microbiology, 1999. **33**(6): p. 1254-1266.
23. Moeys, S., et al., *A sex-inducing pheromone triggers cell cycle arrest and mate attraction in the diatom *Seminavis robusta**. Scientific Reports, 2016. **6**.
24. Korunic, Z., *Diatomaceous earths, a group of natural insecticides*. Journal of Stored Products Research, 1998. **34**(2,3): p. 87-97.
25. Chandler, C., *Diatomaceous Earth: The Wonder Powder*. Northern Woodlands, 2006.

26. EFMA. *Dynamic Diatomite: The Universal Uses of Diatomaceous Earth*. (geraadpleegd op: 27/04/2017); Beschikbaar op: <http://www.efma.org/diatomite/>.
27. Levitan, O., et al., *Diatoms: a fossil fuel of the future*. Trends in Biotechnology, 2014. **32**(3): p. 117-124.
28. Hildebrand, M., et al., *The place of diatoms in the biofuels industry*. Biofuels, 2012. **3**(2): p. 221–240.
29. Wang, J. en Seibert, M., *Prospects for commercial production of diatoms*. Biotechnology for Biofuels, 2017. **10**.
30. Bozarth, A., Maier, U. en Zauner, S., *Diatoms in biotechnology: modern tools and applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **82**(2): p. 195-201.
31. Yaakob, Z., et al., *An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture*. Journal of Biological Research, 2014. **21**(1).
32. O'Neill, J.C., et al., *New and Unexpected Insights into the Modulation of LuxR-type Quorum Sensing by Cyclic Dipeptides*. ACS Chemical Biology, 2009. **4**(12): p. 1051-1059.
33. Giessen, T.W. en Marahiel, M.A., *Rational and combinatorial tailoring of bioactive cyclic dipeptides*. Frontiers in Microbiology, 2015. **6**.
34. Borthwick, A.D., *2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products*. Chemical Reviews, 2012. **112**(7): p. 3641-3716.
35. Szardenings, A.K., et al., *A simple procedure for the solid phase synthesis of diketopiperazine and diketomorpholine derivatives*. Tetrahedron, 1997. **53**(19): p. 6573-6593.
36. Martins, M.B. en Carvalho, I., *Diketopiperazines: biological activity and synthesis*. Tetrahedron, 2007. **63**(40): p. 9923-9932.
37. Ferro, J.N., et al., *Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behaviour and inflammatory response in mice*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2015. **42**(12): p. 1287-1295.
38. Cornacchia, C., et al., *2,5-diketopiperazines as neuroprotective agents*. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2012. **12**(1): p. 2-12.
39. *Drugs*. (geraadpleegd op: 19/03/2017); Beschikbaar op: <http://www.drugs.com>.
40. Axel, C., et al., *Quantification of cyclic dipeptides from cultures of Lactobacillus brevis R2Delta by HRGC/MS using stable isotope dilution assay*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(9-10): p. 2433-2444.
41. Faden, A.I., et al., *Novel Diketopiperazine Enhances Motor and Cognitive Recovery after Traumatic Brain Injury in Rats and Shows Neuroprotection In Vitro and In Vivo*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2003. **23**(3): p. 342-354.
42. Zutz, C., et al., *Valproic Acid Induces Antimicrobial Compound Production in Doratomyces microspores*. Frontiers in Microbiology, 2016. **7**: p. 510-522.
43. Guan, J., et al., *NNZ-2591, a novel diketopiperazine, prevented scopolamine-induced acute memory impairment in the adult rat*. Behavioural Brain Research, 2010. **210**(2): p. 221-228.
44. Guan, J. en Gluckman, P.D., *IGF-1 derived small neuropeptides and analogues: a novel strategy for the development of pharmaceuticals for neurological conditions*. British Journal of Pharmacology, 2009. **157**(6): p. 881-891.
45. Guan, J., et al., *The role for IGF-1-derived small neuropeptides as a therapeutic target for neurological disorders*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2015. **19**(6): p. 785-793.
46. *Traumatic Brain Injury*. (geraadpleegd op: 19/03/2017); Beschikbaar op: www.traumaticbraininjury.com.
47. Wu, L., et al., *Induction of systemic disease resistance in Nicotiana benthamiana by the cyclodipeptides cyclo (l-Pro-l-Pro) and cyclo (d-Pro-d-Pro)*. Molecular Plant Pathology, 2017. **18**(1): p. 67-74.
48. Chen, X., et al., *Cyclic dipeptides produced by fungus Eupenicillium brefeldianum HMP-F96 induced extracellular alkalization and H2O2 production in tobacco cell suspensions*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015. **31**(1): p. 247-253.
49. Chen, Y., et al., *A new diketopiperazine from South China Sea marine sponge Callyspongia sp.* Natural Product Research, 2014. **28**(13): p. 1010-1014.
50. Ginz, M. en Engelhardt, U.H., *Identification of Proline-Based Diketopiperazines in Roasted Coffee*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(8): p. 3528-3532.

51. Bills, G.F. en Gloer, J.B., *Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi*. Microbiology Spectrum, 2016. **4**(6).
52. Lautru, S., et al., *The Albonoursin Gene Cluster of S. noursei: Biosynthesis of Diketopiperazine Metabolites Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases*. Chemistry & Biology, 2002. **9**(12): p. 1355-1364.
53. Belin, P., et al., *The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways*. Natural Product Reports, 2012. **29**(9): p. 961-979.
54. Sauguet, L., et al., *Cyclodipeptide synthases, a family of class-I aminoacyl-tRNA synthetase-like enzymes involved in non-ribosomal peptide synthesis*. Nucleic Acids Research, 2011. **39**(10): p. 4475-4489.
55. Gondry, M., et al., *Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes*. Nature Chemical Biology, 2009. **5**(6): p. 414-420.
56. Moutiez, M., et al., *Unravelling the mechanism of non-ribosomal peptide synthesis by cyclodipeptide synthases*. Nature Communications, 2014. **5**.
57. Giessen, T.W. en Marahiel, M.A., *The tRNA-dependent biosynthesis of modified cyclic dipeptides*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(8): p. 14610-14631.
58. Jacques, I.B., et al., *Analysis of 51 cyclodipeptide synthases reveals the basis for substrate specificity*. Nature Chemical Biology, 2015. **11**(9): p. 721-727.
59. Moutiez, M., et al., *Specificity determinants for the two tRNA substrates of the cyclodipeptide synthase AlbC from Streptomyces noursei*. Nucleic Acids Research, 2014. **42**(11): p. 7247-7258.
60. Stachelhaus, T. en Marahiel, M.A., *Modular Structure of Peptide Synthetases Revealed by Dissection of the Multifunctional Enzyme GrsA*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(11): p. 6163-6169.
61. Marahiel, M.A., *Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics*. Chemistry & Biology, 1997. **4**(8): p. 561-567.
62. Shen, Q.T., et al., *Dissecting and exploiting nonribosomal peptide synthetases*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2004. **36**(4): p. 243-249.
63. Belshaw, P.J., Walsh, C.T. en Stachelhaus, T., *Aminoacyl-CoAs as Probes of Condensation Domain Selectivity in Nonribosomal Peptide Synthesis*. Science, 1999. **284**(5413): p. 486-489.
64. Gulick, A.M., *Conformational Dynamics in the Acyl-CoA Synthetases, Adenylation Domains of Non-ribosomal Peptide Synthetases, and Firefly Luciferase*. ACS Chemical Biology, 2009. **4**(10): p. 811-827.
65. Gonzalez, O., et al., *Non-ribosomal Peptide Synthetases from Pseudomonas aeruginosa Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host*. Microbial Ecology, 2016.
66. Garneau-Tsodikova, S., et al., *Protein Assembly Line Components in Prodigiosin Biosynthesis: Characterization of PigA,G,H,I,J*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(39): p. 12600-12601.
67. Payne, J., et al., *Diversity of nature's assembly lines - recent discoveries in non-ribosomal peptide synthesis*. Molecular BioSystems, 2017. **13**(1): p. 9-22.
68. Stachelhaus, T., Hüser, A. en Marahiel, M.A., *Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases*. Chemistry & Biology. **3**(11): p. 913-921.
69. Lai, J.R., Koglin, A. en Walsh, C.T., *Carrier Protein Structure and Recognition in Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthesis*. Biochemistry, 2006. **45**(50): p. 14869-14879.
70. Stein, T., et al., *The Multiple Carrier Model of Nonribosomal Peptide Biosynthesis at Modular Multienzymatic Templates*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(26): p. 15428-15435.
71. Stachelhaus, T., et al., *Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(35): p. 22773-27781.
72. Bloudoff, K., Alonzo, D. en Schmeing, T.M., *Chemical Probes Allow Structural Insight into the Condensation Reaction of Nonribosomal Peptide Synthetases*. Cell Chemical Biology. **23**(3): p. 331-339.

73. Marahiel, M.A., *Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis*. Journal of Peptide Science, 2009. **15**(12): p. 799-807.
74. Kohli, R.M., et al., *Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases*. Biochemistry, 2001. **40**(24): p. 7099-7108.
75. Trauger, J.W., et al., *Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 215-218.
76. Moeys, S., Vyverman, W. en De Veylder, L., *Sex-signalling and mating type determination in the benthic pennate diatom seminavis robusta*. 2015. Ghent University, Doctoraatsthesis.
77. Delauney, A.J. en Verma, D.P.S., *Proline biosynthesis and osmoregulation in plants*. The Plant Journal, 1993. **4**(2): p. 215-223.
78. Hu, C.A., Delauney, A.J. en Verma, D.P., *A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(19): p. 9354-9358.
79. Liu, Y., et al., *Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(25): p. 13414-13419.
80. Kasahara, M., et al., *An adenylyl cyclase with a phosphodiesterase domain in basal plants with a motile sperm system*. Scientific Reports, 2016. **6**.
81. Richter, W., et al., *Identification of inhibitor binding sites of the cAMP-specific phosphodiesterase*. Cellular Signalling, 2001. **13**(4): p. 287-297.
82. Potter, L.R., *Guanylyl cyclase structure, function and regulation*. Cellular Signalling, 2011. **23**(12): p. 1921-1926.
83. Gross, I. en Durner, J., *In Search of Enzymes with a Role in 3', 5'-Cyclic Guanosine Monophosphate Metabolism in Plants*. Frontiers in Plant Science, 2016. **7**: p. 576-585.
84. Friebe, A. en Koesling, D., *Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. Circulation Research, 2003. **93**(2): p. 96-105.
85. Wuts, P.G.M. en Greene, T.W., *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*. 2006: John Wiley & Sons, Inc.
86. Keller, O., et al., *tert-Butoxycarbonylation of Amino Acids and their Derivatives: N-tert-Butoxycarbonyl-L-phenylalanine*, in *Organic Syntheses*. 2003, John Wiley & Sons, Inc.
87. Giri, P., et al., *Process for the preparation of n-protected (5s)-5-(1,3-thiazolidin-3-ylcarbonyl)pyrrolidin-3-one*. 2015, Google Patents.
88. Shamala, N., Row, T.N.G. en Venkatesan, K., *Crystal and molecular structure of allo-4-hydroxy-L-proline dihydrate*. Acta Crystallographica 1976. **32**(12): p. 3267-3270.
89. Wright, B.A. en Cole, P.A., *Preliminary examination of the crystal structure of L-proline*. Acta Crystallographica, 1949. **2**(2): p. 129-130.
90. Benedetti, E., et al., *Preferred conformation of the tert-butoxycarbonyl-amino group in peptides*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 1980. **16**(2): p. 156-172.
91. Bonneure, E., *Ongepubliceerde resultaten*. 2017.
92. De Luca, L., Giacomelli, G. en Porcheddu, A., *A very mild and chemoselective oxidation of alcohols to carbonyl compounds*. Organic Letters, 2001. **3**(19): p. 3041-3043.
93. De Luca, L., et al., *Trichloroisocyanuric/TEMPO oxidation of alcohols under mild conditions: a close investigation*. Journal of Organic Chemistry, 2003. **68**(12): p. 4999-5001.
94. Fischer, E. en Speier, A., *Darstellung der Ester*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1895. **28**(3): p. 3252-3258.
95. Gauchot, V. en Schmitzer, A.R., *Asymmetric aldol reaction catalyzed by the anion of an ionic liquid*. Journal of Organic Chemistry, 2012. **77**(11): p. 4917-4923.
96. Ikubo, M., et al., *Structure-activity relationships of lysophosphatidylserine analogs as agonists of G-protein-coupled receptors GPR34, P2Y10, and GPR174*. Journal of Medicinal Chemistry, 2015. **58**(10): p. 4204-4219.
97. Marusawa, H., et al., *Synthesis and biological activity of 1-phenylsulfonyl-4-phenylsulfonylaminopyrrolidine derivatives as thromboxane A₂ receptor antagonists*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002. **10**(5): p. 1399-1415.

98. Nudelman, A., et al., *Acetyl Chloride-Methanol as a Convenient Reagent for: A) Quantitative Formation of Amine Hydrochlorides B) Carboxylate Ester Formation C) Mild Removal of N-t-Boc-Protective Group*. Synthetic Communications, 1998. **28**(3): p. 471-474.
99. Lewis, N.J., et al., *Synthetic sulfur-containing amino acids. Inhibition of transport systems in S37 ascites tumor cells*. Journal of Medicinal Chemistry, 1978. **21**(10): p. 1070-1073.
100. Braga, A.L., et al., *Modular chiral thiazolidine catalysts in asymmetric aryl transfer reactions*. Tetrahedron: Asymmetry, 2006. **17**(19): p. 2793-2797.
101. Tan, F., et al., *Design and Synthesis of New 2-Aryl-4,5-Dihydro-thiazole Analogues: In Vitro Antibacterial Activities and Preliminary Mechanism of Action*. Molecules, 2015. **20**(11): p. 20118-20130.
102. Dubinsky, L., et al., *Synthesis and validation of a probe to identify quorum sensing receptors*. Chemical Communications, 2009(47): p. 7378-7380.
103. Dormán, G. en Prestwich, G.D., *Using photolabile ligands in drug discovery and development*. Trends in Biotechnology, 2000. **18**(2): p. 64-77.
104. Srinivas, N., et al., *Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in Pseudomonas aeruginosa*. Science, 2010. **327**(5968): p. 1010-1013.
105. Meijden, B.V.d. en Robinson, J.A., *Synthesis and application of photoproline - a photoactivatable derivative of proline*. Arkivoc, 2010. **2011**(6): p. 130-136.
106. Kitahara, K., Shimokawa, J. en Fukuyama, T., *Stereoselective synthesis of spirotryprostatin A*. Chemical Science, 2014. **5**(3): p. 904-907.
107. Bondoc, K.G., et al., *Searching for a Mate: Pheromone-Directed Movement of the Benthic Diatom Seminavis robusta*. Microbial Ecology, 2016. **72**(2): p. 287-294.
108. Vičar, J., Buděšínský, M. en Bláha, K., *Proton magnetic resonance studies of cyclodipeptides containing pipecolic acid, proline and/or 2-azetidine-carboxylic acid*. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 1972. **38**: p. 1940-1956.
109. Friedrich, A., et al., *One-Pot Synthesis of Symmetrical and Unsymmetrical Diketopiperazines from Unprotected Amino Acids*. Synlett, 2007. **2007**(13): p. 2127-2129.
110. Geerardyn, E., et al., *Seksferomonen bij diatomeeën*. 2017. Ghent University, Bachelorproef.
111. Corporation, W., *Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates*. 2014.
112. Maxwell, K. en Johnson, G.N., *Chlorophyll fluorescence - a practical guide*. Journal of Experimental Botany, 2000. **51**(345): p. 659-668.