

Entwicklung einer effizienten Synthese von Isoxazolin-Aminosäureesterderivaten

Entwicklung und Anwendung von 7-Dialkyl- Aminocumarin-Fluoreszenz-Labels

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
Dipl. Chem. Lisa Wirtz

Saarbrücken
2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2008 bis Januar 2012 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Kazmaier an der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes angefertigt.

Tag des Kolloquiums: 09. März 2012

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm F. Maier

Berichtersteller: Prof. Dr. Uli Kazmaier
Prof. Dr. Dr. h. c. Theophil Eicher

*Meiner Familie
und Henrik*

Abstract

Within the scope of this thesis a straightforward approach towards isoxazoline amino acid esters was developed. The synthesis of these new structures was described by a combination of a Michael addition with chelated glycine ester enolates to nitroalkenes, *in situ* nitrile oxide transformation and 1,3-dipolar cycloaddition. The dipolarophile required for the cycloaddition was introduced either *via* the nitroalkene or *via* the chelated enolate. Therefore, different types of heterocyclic amino acids could be obtained in a simple one-pot protocol.

The second part of the thesis deals with the synthesis and the spectroscopic characterization of fluorescence dyes based on 7-(dialkylamino)coumarins. These labels allow the investigation of cellular processes or target identification. One label acted also as false fluorescent neurotransmitter in the adrenalin exocytosis of chromaffin cells (in cooperation with Prof. J. Rettig, Uniklinik Homburg). Furthermore, some coumarins were attached to amino acids and peptides by bioorthogonal reactions for the biomolecular imaging. In these reactions, the labels were fixed to the C-terminus, N-terminus and an amino acid sidechain. Even the amino acid backbone was labeled.

Kurzfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine effiziente Eintopfsynthese verschiedener Isoxazolin-Aminosäureesterderivate entwickelt werden. Durch Kombination der Michael-Addition eines chelatisierten TFA-Glycinester-Enolats an ein Nitroalken mit einer *in situ* Nitriloxid-Transformation und einer anschließenden 1,3-dipolaren Cycloaddition konnte der Aufbau neuer heterocyclischer Strukturen aus einfachen Vorstufen in nur einem Schritt ermöglicht werden. Das für die Cycloaddition benötigte Dipolarophil wurde sowohl über das Nukleophil als auch über das Nitroalken eingeführt.

Im zweiten Teil wurden Fluoreszenz-Labels auf 7-Dialkyl-Aminocoumarin-Basis für das biomolekulare *Imaging* synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert. Eines dieser Labels fand zudem Anwendung als *false fluorescent neurotransmitter* in der Exozytose-Visualisierung von Adrenalin in Chromaffinzellen (Kooperation Prof. J. Rettig, Uniklinik Homburg). Des Weiteren wurden verschiedene Labels in bioorthogonalen Reaktionen zum Fluoreszenzmarkieren von Aminosäuren und Peptiden eingesetzt. Hierbei gelang neben der Markierung des N-Terminus, des C-Terminus und einer Aminosäure-Seitenkette auch die Markierung des Aminosäurerückgrates.

Inhaltsverzeichnis

Teil A Entwicklung einer effizienten Synthese von Isoxazolin-Aminosäureesterderivaten

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	3
2.1	Die Michael-Addition	3
2.1.1	Allgemeines	3
2.1.2	Stereochemische Modelle	5
2.1.3	Michael-Additionen an Nitroalkene	8
2.2	Cycloadditionen	11
2.2.1	1,3-dipolare Cycloadditionen	11
2.2.2	Erzeugung von Nitriloxiden aus Nitroverbindungen	14
2.3	Synthese von Isoxazolinen <i>via</i> Michael-Addition und sequentielle Nitriloxid-Cycloaddition	16
3	Ergebnisse und Diskussion	20
3.1	Problemstellung	20
3.2	Entwicklung der Eintopfsequenz Michael-Addition/Nitriloxidbildung und 1,3-dipolare Cycloaddition	21
3.2.1	Einführung des Dipolarophils über das Nitroalken	22
3.2.2	Einführung des Dipolarophils über das Nukleophil	27

Teil B Entwicklung und Anwendung von 7-Dialkyl-Aminocumarin-Fluoreszenz-Labels

4	Einleitung	32
5	Kenntnisstand	35
5.1	Grundlagen der Fluoreszenz	35
5.2	Fluoreszenzmikroskopie im Forschungsbereich der <i>Life Sciences</i>	37
5.3	Fluorophore in den <i>Life Sciences</i>	38
5.3.1	Fluoreszenzproteine	39
5.3.2	<i>Quantum dots</i>	40
5.3.3	Organische Fluorophore	40
5.4	Chemische, kovalente Proteinmarkierungstechniken	47

6	Ergebnisse und Diskussion	54
6.1	Problemstellung	54
6.2	Synthese und Charakterisierung eines <i>false fluorescent neurotransmitters</i> (FFN)	55
6.2.2	Bestimmung der spektroskopischen Daten des <i>false fluorescent neurotransmitters</i> (FFN)	59
6.2.3	Einsatz des FFN in die physiologischen Untersuchungen zur Adrenalin-Exozytose	63
6.3	Synthese und Charakterisierung verschiedener cumarinbasierter Fluoreszenzfarbstoffe	66
6.3.1	Synthese von Aminocumarinen mit unterschiedlichen Seitenketten	67
6.3.2	Synthese von Aminocumarinen mit erweitertem π -System	70
6.3.3	Spektroskopische Charakterisierung aller Aminocumarine	73
6.3.4	Einsatz der Aminocumarine in das biologische Testsystem	77
6.4	Entwicklung von Markierungs-Methoden von Aminosäuren und Peptiden mit 7-Dialkyl-Aminocumarin-Fluoreszenz-Labels	79
6.4.1	Markierung durch Kupfer-katalysierte Azid-Acetylen-Click-Chemie	79
6.4.2	Markierung durch C-C-Knüpfungs-Reaktionen am Peptidrückgrat	85
7	Experimenteller Teil	93
7.1	Allgemeine Angaben	93
7.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	95
7.3	Synthese der Verbindungen	98
8	Zusammenfassung	174
8.1	Entwicklung einer effizienten Synthese von Isoxazolin- Aminosäureesterderivaten (Teil A)	174
8.2	Entwicklung und Anwendung von 7-Dialkyl-Aminocumarin-Fluoreszenz-Labels (Teil B)	175
8.2.1	Synthese und Charakterisierung eines <i>false fluorescent neurotransmitters</i> (FFN) und dessen Aminocumarin-Derivate	175
8.2.2	Entwicklung von Fluoreszenz-Labels und deren Anwendung zur Modifizierung von Aminosäuren und Peptiden	177
9	Literaturverzeichnis	180

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift	FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
abs.	absolut	FFN	<i>false fluorescent neurotransmitter</i>
Abs	Absorption	FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
AIBN	Azo-bis-(<i>isobutyronitril</i>)		
Äq.	Äquivalent		
B	Base	GC	Gaschromatographie
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl	GFP	Grünfluoreszierendes Protein
BODIPY	Bordipyrrol		
Bu	Butyl	H	Stunde
		Hal	Halogen
CA	Cycloaddition	Hex	Hexan
CDI	1,1`-Carbonyldiimidazol	HMDS	Hexamethyldisilazan
CI	Chemische Ionisation	HMPA	Hexamethylphosphoramid
CuAAC	Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Cum	Cumarin	HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
d	Tag		
DA	Dalton	INOC	Intramolekulare Nitriloxid Cycloaddition
DC	Dünnschichtchromatographie	<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -Propyl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	kat.	katalytisch
DCM	Dichlormethan		
DFT	Dichtefunktionaltheorie	LDA	Lithiumdi- <i>iso</i> -propylamid
DIBALH	Di- <i>iso</i> -butylaluminiumhydrid	LHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
DIPA	Di- <i>iso</i> -propylamin	LTMP	Lithium-2,2,4,4-tetramethylpiperidid
DIPEA	Di- <i>iso</i> -propylethylamin		
DMAP	4-Dimethylaminopyridin	M	Molar
DME	Dimethoxyethan	MA	Michael-Addition
DMF	Dimethylformamid	Me	Methyl
DMPP	Dimethylpyrazolphosphat	MHz	Megahertz
DMSO	Dimethylsulfoxid	Max.	Maximum
DNA	Desoxyribonukleinsäure	min	Minuten
dr	Diastereomerenverhältnis	MMPP	Magnesium mono-peroxyphthalat Hexahydrat
ds	Diastereoselektivität	MS	Massenspektrometrie
d. Th.	der Theorie		
EE	Essigsäureethylester	NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
Em	Emission	<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
ESI	Elektronenspray Ionisation	NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
Et	Ethyl	NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
EWG	Electron-withdrawing Group		
Ex	Anregung		

nm	Nanometer	<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholino- <i>N</i> -oxid	TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborat
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)		
ns	Nanosekunden	TCT	2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazin
Nu	Nukleophil	Tf	Triflat
		TEA	Triethylamin
PE	Petrolether	TFA	Trifluoressigsäure
	henyl	THF	Tetrahydrofuran
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> -Propyl	TIRFM	<i>Total Internal Refection Fluorescence Microscopy</i>
Pr	Propyl		
		TMS	Trimethylsilyl
R	Rest	<i>t</i> _R	Retentionszeit
R _f	Retentionsfaktor		
RT	Raumtemperatur	UdS	Universität des Saarlandes
		ü.N.	über Nacht
s	Sekunden	UV	Ultraviolett
SG	Schutzgruppe		
		VMAT	Vesikuläre Monamin-Transporter
T3P	Propylphosphonanhydrid		
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid		
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl		

Teil A

**Entwicklung einer effizienten
Synthese von Isoxazolin-
Aminosäureesterderivaten**

1 Einleitung

Isoxazoline gehören zu einer der bedeutendsten Klasse von N,O-Heterocyclen. Diese Heterocyclen finden nicht nur in einer Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen als Kernstrukturen Anwendung, sondern sie stellen auch wichtige Syntheseintermediate in der organischen Chemie dar.^[1, 2] Zahlreiche Anwendungsbeispiele von Isoxazolinen als Schlüsselbausteine in der Totalsynthese von Naturstoffen sowie Medikamenten, wie z.B. Taxol, sind bekannt (Abbildung 1.1).^[1-3] Durch Umwandlung von Isoxazolin-Intermediaten lassen sich verschiedene 1,3-bifunktionale Strukturen (z.B. β -Hydroxyketone, α,β -ungesättigte Ketone oder γ -Aminosäuren)^[4-6] herstellen.

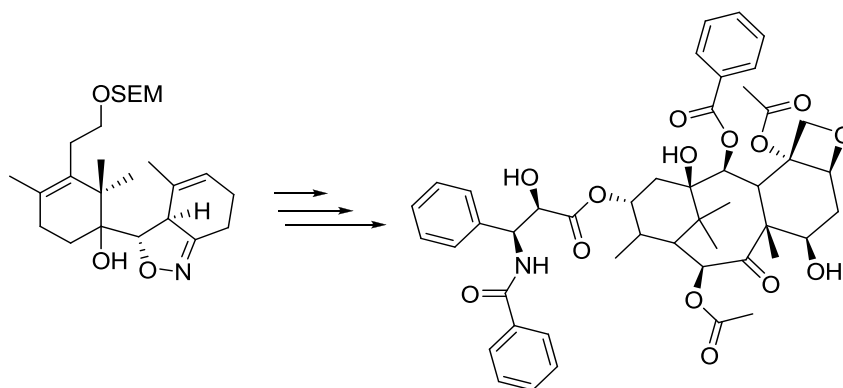
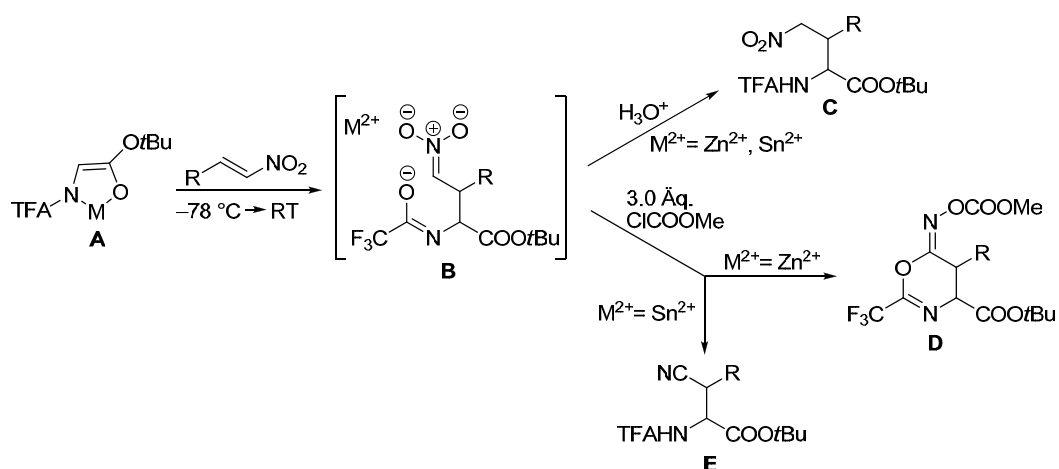


Abbildung 1.1 Synthese von Taxol über ein Isoxazolin-Intermediat.

Das große Anwendungsspektrum der Isoxazoline ist in ihrer breiten Verfügbarkeit begründet. Nach Huisgen *et al.* sind diese fünfgliedrigen Heterocyclen durch 1,3-dipolare Nitriloxid-Cycloaddition an Alkene leicht synthetisierbar.^[7, 8] Die hierzu benötigten Nitriloxide können sowohl durch Oxidation von Oximen^[9] als auch durch Dehydratisierung von Nitroalkenen^[10] gewonnen werden. Aufgrund der hohen Reaktivität der Nitriloxide addieren diese Dipole schnell an Alkene, Alkine und Carbonyle. Bei diesen Additionen gehen Nitriloxide aber auch zahlreiche Nebenreaktionen wie z.B. die Dimerisierung zum Oxadiazol-*N*-oxid ein. Um eine Bildung von Nebenprodukten zu minimieren, werden Nitriloxide meist in Gegenwart

eines Überschusses an Dipolarophil generiert. Als besonders interessante Nitriloxid-Vorstufen erweisen sich Nitroalkene. Die elektronenarme Doppelbindung des Nitroalkens ist ein ausgezeichneter Michael-Akzeptor, der die Einführung eines Dipolarophils *via* Michael-Addition ermöglicht. Das hierbei gebildete Nitronat kann *in situ* mit wasserentziehenden Mitteln wie Phenylisocyanaten^[11] oder Chloroformiaten^[12] in das Nitriloxid umgewandelt werden, welches eine intramolekulare Cycloaddition eingeht. Dass Nitroalkene interessante Substrate für Michael-Additionen und deren Folgereaktionen sind konnte bereits durch die Arbeitsgruppe von Prof. Kazmaier gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit vielen Jahren mit der stereoselektiven Synthese von Aminosäuren. Der Forschungsschwerpunkt liegt dabei auf chelatisierten Aminosäureesterenolaten, deren synthetisches Potential als hoch reaktive Nucleophile in einer Vielzahl von C-C-Knüpfungsreaktionen wie der Esterenolat-Claisen-Umlagerung,^[13] der Aldol-Reaktion^[14] oder der Michael-Addition^[15] aufgezeigt werden konnten. Besonders Nitroalkene haben sich als exzellente Akzeptoren für diese chelatisierten Enolate **A** hervorgetan. Sie bieten in Abhängigkeit der Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen ein breites Produktspektrum. Durch Hydrolyse des in der Michael-Addition gebildeten Nitronates **B** wird das Michael-Produkt **C** gebildet,^[16] während bei Abfangen mit Carbonsäurehalogeniden oder Chloroformiaten entweder das Iminooxazin **D**^[17] oder das Nitril **E**^[18] als Produkt entsteht.



Schema 1.1 Produktspektrum der Michael-Addition chelatisierter Aminosäureesterenolate an Nitroalkene.

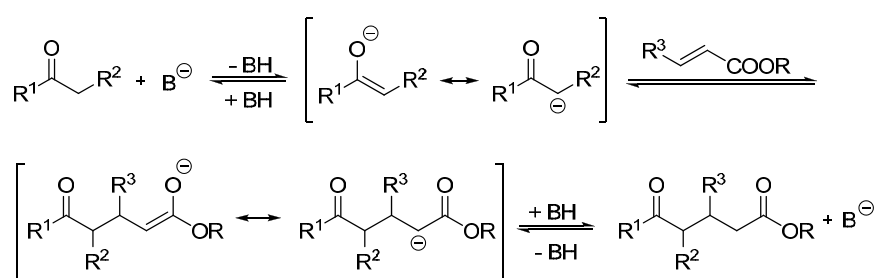
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Produktspektrum der Michael-Addition zu erweitern und über eine Dominoreaktion aus Michael-Addition/Nitriloxidbildung/intramolekulare Nitriloxid-Cycloaddition eine effektive Synthese von Isoxazolin-Aminosäureesterderivaten zu entwickeln. Die Zugabe eines wasserentziehenden Mittels sollte Nitronat **B** in das Nitriloxid überführen, das spontan zum Isoxazolin-Aminosäurederivat cyclisiert. Je nachdem, ob das Dipolarophil *via* Michael-Addition über das Nucleophil oder den Akzeptor eingeführt wird, könnten unterschiedliche Derivate erhalten werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Die Michael-Addition

2.1.1 Allgemeines

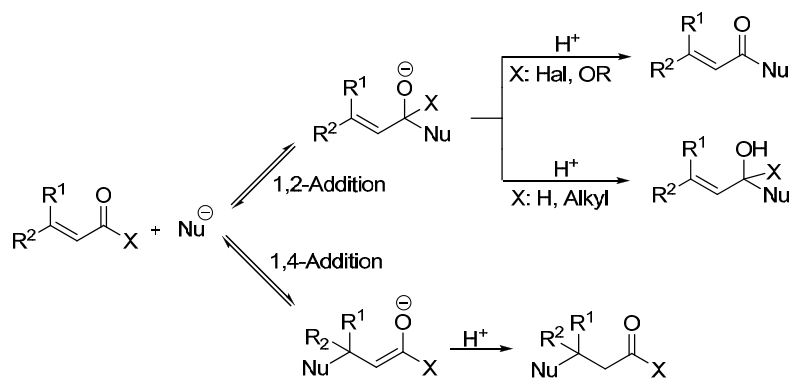
Eine der meist genutzten und bedeutendsten C-C-Knüpfungsreaktionen ist die Michael-Addition.^[19] Namensgebend für diese Knüpfungsreaktion ist der amerikanische Chemiker Arthur Michael, der diese konjugierte 1,4-Addition von Nucleophilen an Alkene mit Elektronenakzeptor-Substituenten (Michael-Akzeptor) untersuchte. Die Michael-Addition hebt sich gegenüber anderen C-C-Knüpfungen durch hohe Variabilität der einsetzbaren Nucleophile und Akzeptorverbindungen hervor. Neben stabilisierten Enolaten können auch Enamine und Metallorganyle als Nucleophile bei der Michael-Addition fungieren. Sowohl α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen, ungesättigte Nitrile als auch Nitroverbindungen finden als Michael-Akzeptoren Anwendung. Die klassische Michael-Addition verwendet C-H-azide Carbonylverbindungen als Nucleophil, welche durch Behandlung mit katalytischen Mengen an Base ein Carbanion ausbilden (Schema 2.1).^[20, 21] Das entstandene Carbanion addiert anschließend nucleophil in β -Position an den α,β -ungesättigten Akzeptor. Im letzten Schritt wird das neu entstandene Enolat durch das verwendete protische Lösungsmittel protoniert, das Produkt wird erhalten und die Base regeneriert. Die Michael-Addition verläuft unter thermodynamischer Kontrolle reversibel.



Schema 2.1 Reaktionsverlauf der Michael-Addition.

Unter Basenkatalyse können unselektive Enolatbildungen, Polymerisationen oder Retro-Michael-Reaktionen auftreten.^[20, 21] Um solche unerwünschten Nebenreaktionen zu minimieren, kann dazu übergegangen werden, stöchiometrischen Basenmengen in die Michael-Addition einzusetzen. Ferner kann die Reaktion unter kinetischer Kontrolle bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden. Bei äquimolarem Einsatz starker Basen wird das Nukleophil zuerst irreversibel deprotoniert und anschließend bei tiefen Temperaturen der Akzeptor zugegeben. Diese Bedingungen bringen dann erneut ein Enolat hervor, welches sich stöchiometrisch in der Reaktionslösung ansammelt. Das sich einstellende Gleichgewicht ist vom relativen Energieunterschied zwischen Produkt- und Eduktenolat abhängig. Neben der basischen Variante sind auch Lewissäure-katalysierte^[21] sowie Übergangsmetall-katalysierte^[22] Varianten der Michael-Addition bekannt.

Werden in die Michael-Addition α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen als Akzeptoren eingesetzt, dann konkurriert die Michael-Addition mit einer 1,2-Addition (Schema 2.2). α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen stellen bezüglich der Regiochemie ambidente Elektrophile dar. Sowohl sterische und elektronische Faktoren der Reaktanten, als auch die Reaktionsbedingungen sind für die Regioselektivität der Addition entscheidend.^[20, 23] Eine 1,2-Addition an der Carbonylgruppe findet im Allgemeinen unter Verwendung harter Nukleophile wie Grignard- und Organolithiumreagenzien statt, während weiche Nukleophile wie stabilisierte Carbanionen oder Organocuprate eine konjugierte Addition eingehen. Ein weiterer Faktor für den regioselektiven Verlauf der Additionen sind sterische Einflüsse. Durch sterisch anspruchsvolle Reste R^1 und R^2 am β -Kohlenstoffatom wird die 1,2-Addition begünstigt. Nukleophile mit hohen sterischen Ansprüchen begünstigen dagegen die Bildung des 1,4-Adduktes.

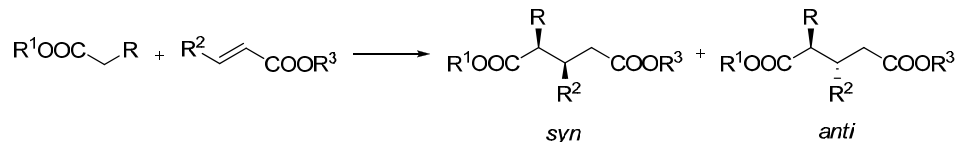


Schema 2.2 Konkurrenz zwischen 1,2- und 1,4-Addition.

2.1.2 Stereochemische Modelle

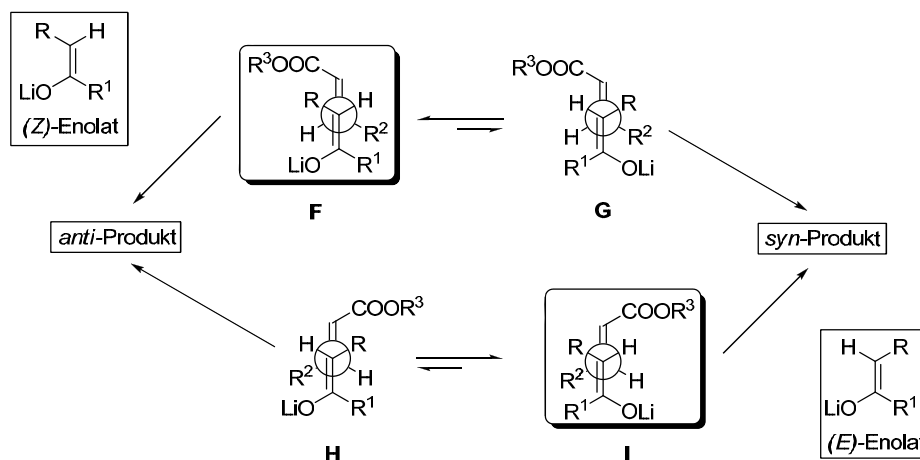
- Relative Diastereoselektivität (*syn* bzw. *anti*)

In der Michael-Addition wird je nach Substitution der C–H-aziden Komponente oder des Akzeptors ein neues Chiralitätszentrum aufgebaut (Schema 2.3).^[24] Um die relative Konfiguration der neu entstandenen Stereozentren zu erklären, bedient sich die Chemie dabei dem Felkin-Ahn-Modell.



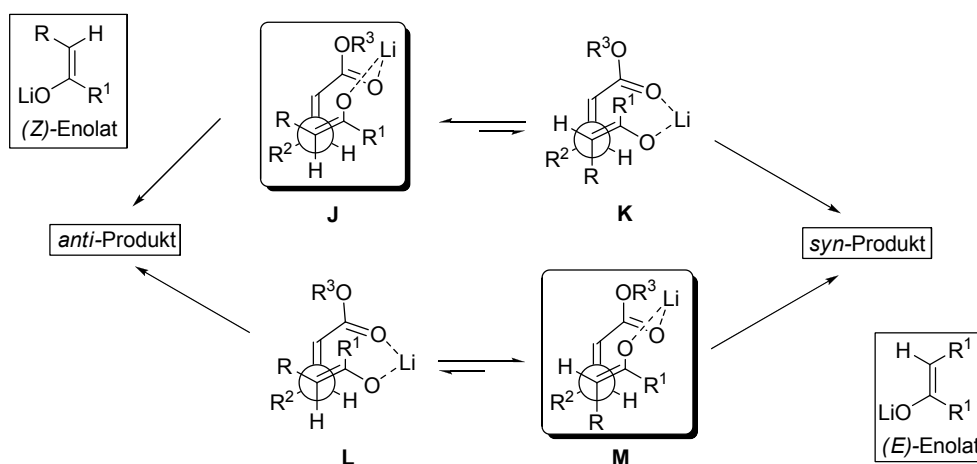
Schema 2.3 Relative Konfiguration der in der Michael-Addition generierten Stereozentren.

Heatcock und Oare *et al.* konnten in systematischen Untersuchungen zeigen, dass bei kinetisch kontrollierten Michael-Additionen eine enge Beziehung zwischen Enolat-Geometrie und Produktkonfiguration besteht.^[20] Bei Verwendung von (*E*)-konfigurierten Lithium-Enolaten wird bevorzugt das *syn*-Michael-Produkt erhalten, während ein (*Z*)-konfiguriertes Enolat eher das *anti*-Michael-Produkt bildet. Dieses Phänomen lässt sich anhand offener Übergangszustände erklären (Schema 2.4). Die sterisch kontrollierten Übergangszustände nehmen die energetisch günstigere, gestaffelte Anordnung ein. In dieser Anordnung herrschen zwischen R und R¹ bzw. R² und OLi Wechselwirkungen, die die Bildung des Produktes kontrollieren. Im Gegensatz zu den Resten R weist Lithium aufgrund seiner großen Koordinationssphäre einen hohen sterischen Anspruch auf. Daher wird bei Einsatz von (*Z*)-Enolaten Übergangszustand **F** und bei (*E*)-Enolaten Übergangszustand **I** begünstigt.^[25]



Schema 2.4 Übergangszustände der Michael-Addition in Abhängigkeit des Enolates.

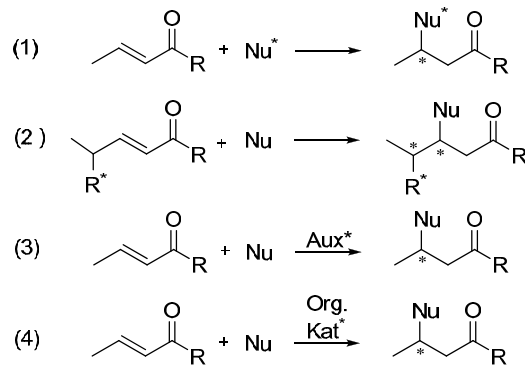
Ein zweites Modell von Heatcock und Oare *et al.* basiert nicht auf sterischen Wechselwirkungen, sondern auf der Koordination der Akzeptor-Carbonylgruppe an das Metallkation des Enolates (cyclischer Übergangszustand, Schema 2.5). Aufgrund der möglichen Koordination richtet sich die Carbonylgruppe des Akzeptors hier in Richtung Enolatsauerstoff aus, sodass ein achtgliedriger Übergangszustand entsteht. Das Metallkation wird dabei vom Enolat auf den Akzeptor übertragen.^[26] In diesem Modell ist der Einfluss der Doppelbindungsgeometrie des Akzeptors auf die Diastereoselektivität der Reaktion ersichtlich. Durch Ändern der Olefingeometrie sollte dann das jeweils andere Diastereomer als Produkt erhalten werden. Dieser Zusammenhang kann jedoch nicht universell auf Michael-Additionen angewendet werden.^[27]



Schema 2.5 Übergangszustände der Michael-Addition in Abhängigkeit von der Koordination der Akzeptor-Carbonylgruppe an das Metallkation des Enolates.

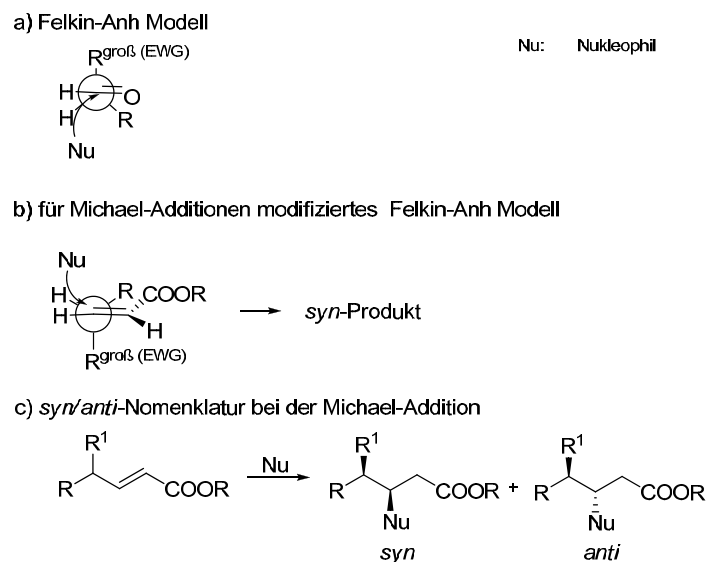
- Absolute Diastereoselektivität

Die Michael-Addition gibt mehrere Ansatzpunkte zur asymmetrischen Induktion. Die Verwendung eines chiralen Nucleophils (**1**) ist eine Möglichkeit, die chirale Information in das Michael-Produkt einzuführen (Schema 2.6).^[27] Weiter kann der stereochemische Verlauf der Michael-Addition durch einen chiralen Akzeptor (**2**) (Schema 2.6)^[27], der beispielsweise in γ -Position ein Chiralitätszentrum trägt, gesteuert werden. Der klassische Weg der asymmetrischen Synthese bedient sich chiralen Auxilliaren (**3**)^[28, 29], während moderne Ansätze Organokatalysatoren (**4**)^[30, 31] verwenden. Die Konfiguration des Produktes wird auch durch enantiomerenreine Additive wie z.B. chirale Lewis-Säuren^[32-35] und Basen^[36] beeinflusst.



Schema 2.6 Asymmetrische Induktion der Michael-Addition.

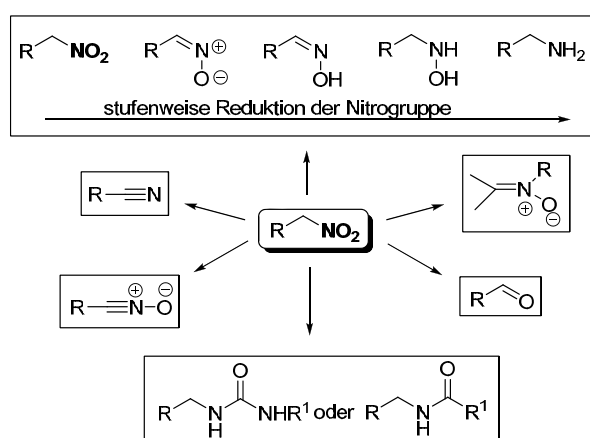
Um Aussagen über den stereochemischen Verlauf des nukleophilen Angriffs bei Michael-Additionen treffen zu können, wurde die Michael-Addition als konjugiertes Analogon der Aldol-Addition betrachtet. Aus dieser Betrachtung wurde ein modifiziertes Felkin-Anh-Modell entwickelt (Schema 2.7).^[37-42] In diesem Modell wird der Aldehyd des Originalmodells durch die C-C-Doppelbindung des Akzeptors ersetzt. Das Felkin-Anh-Modell besagt, dass der größte bzw. der elektronenziehendste Rest im Übergangszustand immer orthogonal zur Doppelbindung der Nachbarposition angeordnet ist. Der Angriff des Nucleophils kann nun von der dem großen Rest abgewandten Seite der Doppelbindung erfolgen. Mit dieser Anordnung im Übergangszustand lassen sich die oft beobachteten *syn*-Selektivitäten vieler konjugierter Additionen erklären.



Schema 2.7 Modelle des stereochemischen Verlauf des nukleophilen Angriff bei Michael-Additionen.

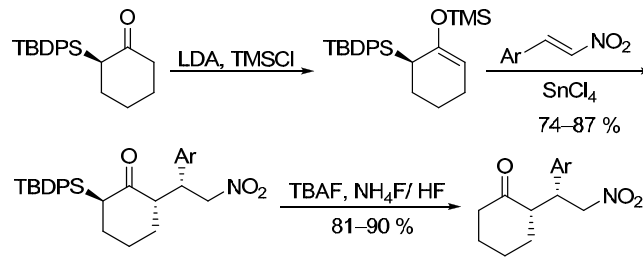
2.1.3 Michael-Additionen an Nitroalkene

Trotz geringer Verbreitung von Nitroverbindungen in der Natur stellen aliphatische Nitroverbindungen bedeutende Syntheseintermediate dar.^[17] Dies ist durch ihre Vielseitigkeit begründet. Solche Schlüsselintermediate können einerseits als Carbonyläquivalent mit umgepolter Polarität reagieren, andererseits kann ihre elektronenziehende Nitrogruppe in eine Vielzahl anderer Funktionalitäten umgewandelt werden (Schema 2.8). Nitroaliphaten lassen sich leicht durch stufenweise Reduktion in Nitrone, Oxime, Hydroxylamine und Amine umwandeln. Über eine Nef-Reaktion^[43-45] sind Aldehyde zugänglich. Des Weiteren können durch die Transformation der Nitrogruppe Amide, Nitrile und Nitriloxide entstehen. Aufgrund dieser Reaktionsvielfalt stellen Nitroalkene attraktive Michael-Akzeptoren dar.^[46]



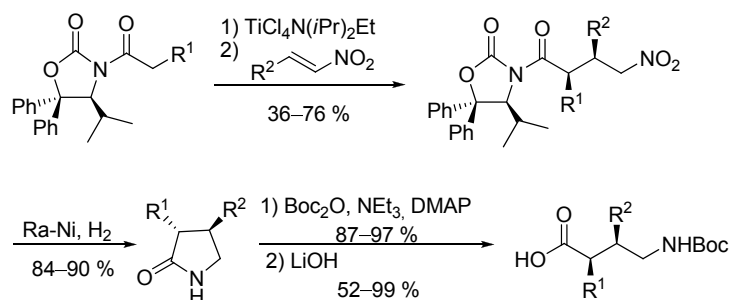
Schema 2.8 Potentielle Transformationen der Nitrogruppe.

Die Michael-Addition an Nitroalkene bietet mehrere Möglichkeiten der asymmetrischen Reaktionsführung (Schema 2.6). Ein Weg, den stereochemischen Verlauf zu kontrollieren, ist die Substratkontrolle.^[47] Als Beispiel für eine Substratkontrolle ist die von Enders *et al.* entwickelte, regioselektive Michael-Addition von chiralen α -Silylketone an Nitroalkene (Schema 2.9) zu nennen.^[28, 29] Bei dieser Addition werden die α -Silylketone aufgrund der sterisch anspruchsvollen *tert*-Butyldimethylsilylgruppe ausschließlich an der Methylengruppe deprotoniert, wodurch die Racemisierung in α -Position verhindert wird. Aus der Michael-Addition des gebildeten α -Silylenolethers an das Aryl-Nitroalken in Anwesenheit von Zinntetrachlorid gingen nach anschließender Desilylierung α,β -disubstituierte γ -Nitroketone hervor. Mithilfe dieser von Enders entwickelten, hochselektiven Methode ließen sich auch acyclische α -Silylketone in α,β -disubstituierte γ -Nitroketone überführen.^[28, 29] Bei dieser Reaktion wurde unter Einsatz von HMPA die Ausbildung eines *E*-/*Z*-Gemisches bei der Enolatbildung unterdrückt und somit ausschließlich das (*Z*)-Enolat erhalten.



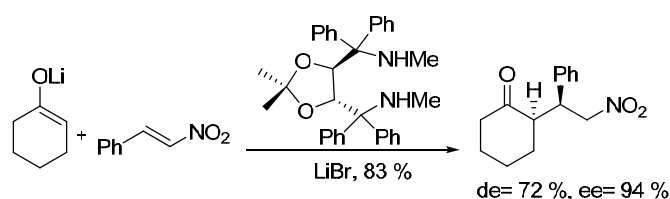
Schema 2.9 Hochselektive Umsetzung von α -Silylketonen zu α,β -disubstituierten γ -Nitroketone *via* Michael-Addition nach Enders *et al.*

Neben der Substratkontrolle lässt sich der stereochemische Verlauf der Michael-Addition auch durch chirale Auxiliare steuern, die meist aus natürlichen Aminosäuren aufgebaut sind.^[28, 29] Mit Hilfe eines Auxiliars synthetisierten Seebach und Mitarbeiter pharmakologisch aktive γ -Lactame und γ -Aminosäuren mit unterschiedlichen Substitutionsmustern (Schema 2.10). Als Schlüsselschritt der Synthese diente die Michael-Addition von Titanenolaten aus *N*-Acylloxazolidinonen an verschiedene alkyl- und arylsubstituierte Nitroalkenen.^[48] Im Anschluss an die 1,4-Addition wurde die Nitrogruppe des Michaeladduktes hydriert, sodass sowohl das γ -Lactam erhalten, als auch das Oxazolidinonauxiliar rückgebildet wurde. Durch Boc-Schützung des Stickstoffs und Lactamöffnung ließen sich die entsprechenden γ -Aminosäuren isolieren.



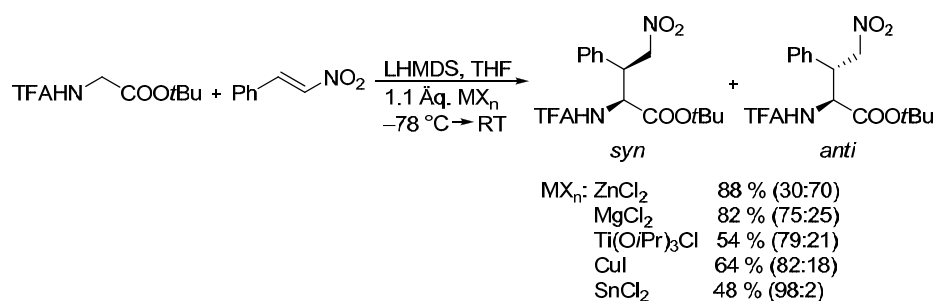
Schema 2.10 Synthese von γ -Lactamen und γ -Aminosäuren nach Seebach *et al.*

Zur asymmetrischen Induktion der Michael-Addition können neben der Substrat- und Auxiliarkontrolle auch enantiomerenreine Additive oder Katalysatoren benutzt werden. In diesem Zusammenhang untersuchten Seebach *et al.* den Einfluss chiraler Additive auf den stereoselektiven Verlauf der Addition von Enolaten an Nitroalkene (Schema 2.11).^[49] Die besten Ergebnisse lieferte die 1,4-Addition von Lithiumenolaten an (*E*)- β -Nitrostyrol mit TADDAMIN in Gegenwart von Lithiumbromid.



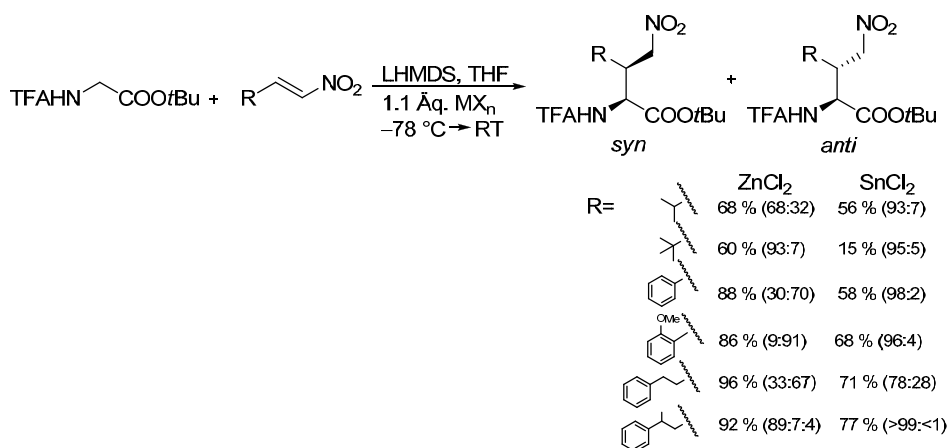
Schema 2.11 Einfluß chiraler Additive auf den stereoselektiven Verlauf der Addition von Enolaten an Nitroalkene nach Seebach *et al.*

Kazmaier *et al.* entwickelten eine Methode zur Michael-Addition, bei der aus *N*-geschützten Glycinestern hochreaktive, chelatisierte Enolate erzeugt und als reaktionsfähige Nucleophile eingesetzt wurden (Schema 2.12).^[16-18] Diese thermisch stabilen Enolate mit fixierter Enolatgeometrie wurden durch Deprotonierung der Glycin-Einheit mit 2.5 Äquivalenten LHMDS und anschließender Transmetallierung mit verschiedenen Metallen generiert. Die chelatisierten Enolate wurden im Anschluss mit verschiedenen Nitroalkenen in einer Michael-Addition umgesetzt. Durch Variation des Metallsalzes versprach sich die Arbeitsgruppe bessere Diastereoselektivitäten. Die besten Ergebnisse wurden mit Zinn(II)- und Zink(II)-chlorid erzielt. Während Zinkchlorid bevorzugt das *anti*-Additionsprodukt in guter Ausbeute und moderater Diastereomerenselectivität lieferte, wurde in Gegenwart von Zinnchlorid fast ausschließlich das *syn*-Produkt in einer Ausbeute von nur 50 % erhalten.



Schema 2.12 Michael-Addition chelatisierter Glycinester-Enolate an Nitroalkene nach Kazmaier *et al.*

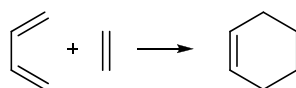
Die Arbeitsgruppe Kazmaier untersuchte neben dem Einfluss des Metallsalzes auch den Einfluss des sterischen Anspruchs des Substituenten an der Nitroalken-Doppelbindung (Schema 2.13).^[16-18] In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass Zinnkomplexe weitaus sensibler bezüglich sterischer Hinderung reagieren als Zinkchelate. Unter Einsatz von Zinkchlorid konnte durch Erhöhung des sterischen Anspruchs die Selektivität erhöht werden. In Gegenwart von Zinnchlorid ließ sich allerdings eine geringfügige Abnahme der Selektivität beobachten.



Schema 2.13 Einfluss des sterischen Anspruchs des Substituenten an der Nitroalken-Doppelbindung.

2.2 Cycloadditionen

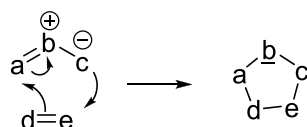
Im Allgemeinen zählen die Cycloadditionen zu den Ringschlussreaktionen. Bei diesen pericyclischen Reaktionen tritt eine cyclische, konzertierte Elektronenverschiebung auf. In den häufigsten Fällen werden hierbei zwei neue σ -Bindungen auf Kosten zweier π -Bindungen geknüpft, was der Bildung eines neuen Ringgerüsts aus zwei einzelnen Fragmenten entspricht. Cycloadditionen werden nach Hoffmann anhand der Zahl der beteiligten Elektronen in jeder Komponente oder nach dem Ordnungsprinzip von Huisgen klassifiziert. Letzteres Prinzip zählt die Zahl der Atome in den jeweiligen Komponenten, die an der Reaktion teilnehmen und dann in den Ring eingebaut werden. Aus dieser Zählweise geht die Ringgröße des entstehenden Adduktes hervor. Eines der bekanntesten Beispiele für eine Cycloaddition ist die Diels-Alder-Reaktion (Schema 2.14), die eine [4+2]-Cycloaddition darstellt.^[7, 50] Sechsringe lassen sich prinzipiell auch durch [3+3], [5+1] oder [2+2+2]-Cycloaddition bilden.



Schema 2.14 Schematische Darstellung der Diels-Alder-Reaktion.

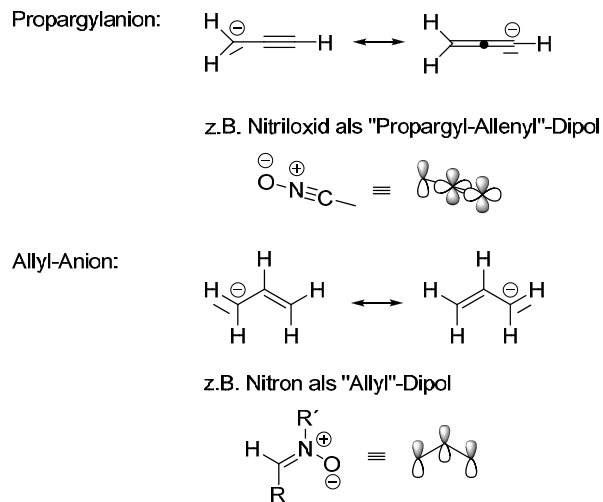
2.2.1 1,3-dipolare Cycloadditionen

Die 1,3-dipolare Cycloaddition zählt zu den synthetisch wichtigsten Reaktionen zur Darstellung von fünfgliedrigen Heterocyclen. Nach der Klassifizierung von Hoffmann ist sie eine [4+2]-Cycloaddition. Bei dieser pericyclischen Reaktion stellt ein 1,3-Dipol vier Elektronen zur Verfügung und kann nur als Struktur mit Formalladung formuliert werden.^[7] Hierzu muss ein 1,3-Dipol a-b-c definiert werden, der ein Atom a mit Elektronensextett und positiver Formalladung sowie ein negatives Ladungszentrum c mit freiem Elektronenpaar besitzt. Die Reaktion eines solchen Dipols mit einem Mehrfachbindungssystem, ein Dipolarophil, bezeichnet man als 1,3-dipolare Cycloaddition (Schema 2.15). Bei diesem von R. Huisgen entwickelten universellen Werkzeug zur Herstellung von fünfgliedrigen Heterocyclen können Alkene, Alkine, aber auch mehrbindige, heteroatomhaltige Gruppen wie Nitrile und Carbonyle als Dipolarophile fungieren.^[7, 8, 51, 52]



Schema 2.15 Verlauf der 1,3-dipolaren Cycloaddition.

Die elektronische Struktur des Dipols entspricht formal der des Propargyl- oder Allylanions (Schema 2.16). Allerdings muss in der nichtionischen Grenzformel des 1,3-Dipols an einem Atom ein Elektronensextett formuliert werden. Folglich tritt neben dem nukleophilen noch ein elektrophiles Endatom in diesem Dreizentersystem auf. Durch diese beiden Zentren kommt auch die besondere Reaktivität der 1,3-Dipole zum Ausdruck. Die Dipole des Propargyl-Allenyl-Typs sind im Gegensatz zu den Allyl-Dipolen wegen ihrer sp-Hybridisierung am mittleren Atom nicht gewinkelt.^[7]

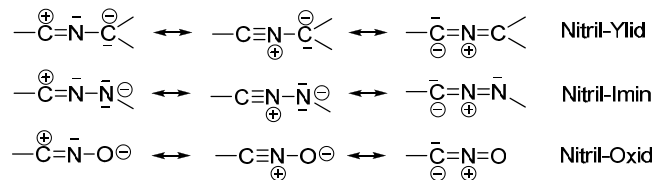


Schema 2.16 Elektronische Struktur des Dipols.

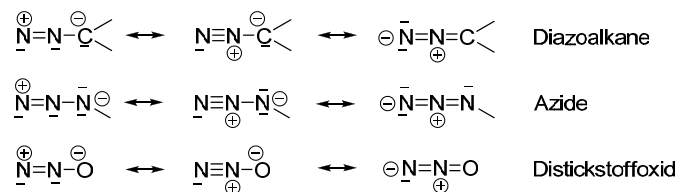
Anfang der 1960iger Jahre führte Huisgen systematische Untersuchungen zur 1,3-dipolaren Cycloaddition durch. Er listete alle untersuchten und potentiellen Dipole auf (Schema 2.17, Schema 2.18).^[53] Alle aufgeführten Verbindungen können in einer mesomeren Grenzform als 1,3-Dipol mit Elektronensextett am elektrophilen Ende beschrieben werden.

1) Propargyl-Allenyl-Typ:

a) Nitrilium-Betaine:



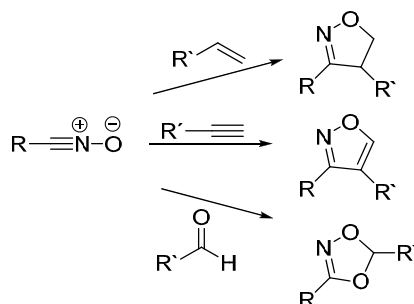
b) Diazonium-Betaine:



Schema 2.17 Dipole des Propargyl-Allenyl-Typs.

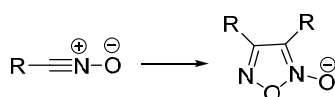
2.2.2 Erzeugung von Nitriloxiden aus Nitroverbindungen

In der Regel handelt es sich bei Nitriloxiden um sehr reaktive, instabile Verbindungen, aus denen über 1,3-dipolare Cycloadditionen mit Dipolarophilen wie Alkenen, Alkinen oder Carbonylverbindungen entsprechende Isoxazoline, Isoxazole bzw. 1,3,4-Dioxazole hergestellt werden können (Schema 2.19).^[54, 55]



Schema 2.19 Reaktion von Nitriloxiden mit Dipolarophilen.

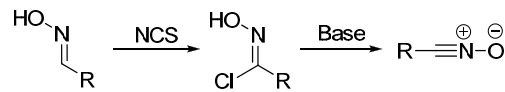
Die hohe Reaktivität der Nitriloxide ist auf der einen Seite vorteilhaft, auf der anderen Seite führt sie zur Bildung von Nebenprodukten in Nitriloxid-Cycloadditionen. Beispielsweise dimerisieren Nitriloxide zum entsprechenden Oxadiazol-*N*-oxid, auch bekannt als Furazan-*N*-oxid oder Furoxan (Schema 2.20). Die zur Cycloaddition konkurrierende Dimerisierung kann durch *in situ* Generierung des Nitriloxids in Gegenwart eines Überschusses an Dipolarophil unterdrückt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Unterdrückung der Dimerisierung bei Arylnitriloxiden ist die Einführung von sterisch anspruchsvollen Gruppen oder elektronenschiebenden Substituenten in 2- und 6-Position, wodurch die Nitriloxidreaktivität unbeeinträchtigt bleibt.^[55, 56]



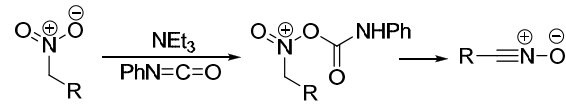
Schema 2.20 Dimerisierung von Nitriloxiden.

Prinzipiell können Nitriloxide aus Aldoximen oder Nitroverbindungen gewonnen werden (Schema 2.21).^[57] Aldoxime liefern durch Einwirken von Chlorierungsmitteln und schwacher Base Nitriloxide, während Nitroverbindungen dehydratisiert werden müssen. Das bekannteste Beispiel zur Nitriloxid-Darstellung durch Dehydratisierung von Nitroverbindungen ist die Mukaiyama-Methode (Schema 2.21). Mukaiyama setzte Phenylisocyanat in Gegenwart einer katalytischen Menge an Triethylamin zur Dehydratisierung ein. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist das Nebenprodukt Diphenylharnstoff, das sich in manchen Fällen schlecht abtrennen lässt. Zudem ist die Mukaiyama-Methode inkompatibel mit freien OH-Gruppen. Dennoch wird sie für oxidationsempfindliche Substrate bevorzugt eingesetzt.^[57]

Nitriloxidherstellung aus Aldoximen:

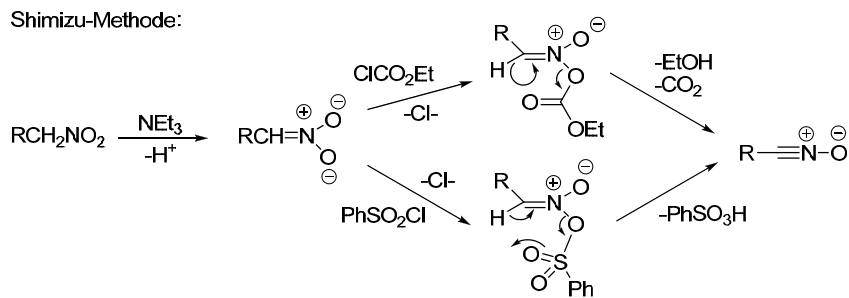


Mukaiyama-Methode:



Schema 2.21 Herstellung von Nitriloxiden über Aldoxime oder Mukaiyama-Methode.

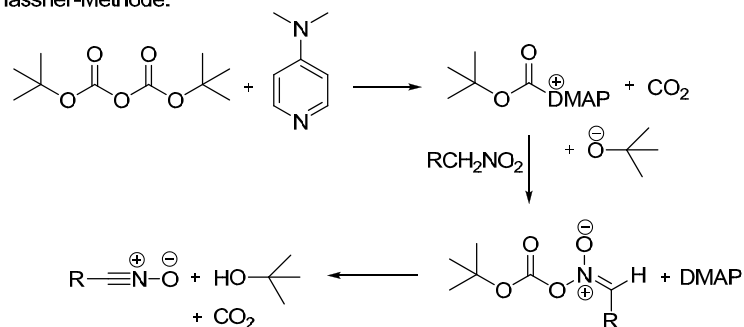
Eine Methode, mit der die teils problematische Abtrennung des Harnstoffs umgangen werden kann, ist die Shimizu-Methode (Schema 2.22). Der Vorteil dieser Vorgehensweise sind die wasserlöslichen Nebenprodukte, welche aus dem Reaktionsgemisch durch Waschen mit Wasser leicht entfernt werden können. Als wasserentziehende Mittel werden Ethylchloroformiat oder Phenylsulfonylchlorid in Gegenwart von Triethylamin eingesetzt.^[12]



Schema 2.22 Herstellung von Nitriloxiden nach Shimizu.

A. Hassner entwickelte ein weiteres, mildes Verfahren zur *in situ* Herstellung von Nitriloxiden aus Nitroalkanen (Schema 2.23). Unter Einwirkung von Di-*tert*-butyldicarbonat und katalytischen Mengen DMAP wird das Nitriloxid in Gegenwart des Dipolarophils generiert. DMAP ist ein guter Acyl-Transfer-Katalysator und limitiert die Bildung des Nitronatesters, was die Reaktion bei Raumtemperatur ermöglicht. Weitere Vorteile dieser Methode sind leicht abtrennbare Nebenprodukte wie CO₂ und *tert*-Butanol sowie die Verwendbarkeit von Substraten mit Amin- oder Alkoholfunktionen ohne vorherige Schützung.^[58]

Hassner-Methode:

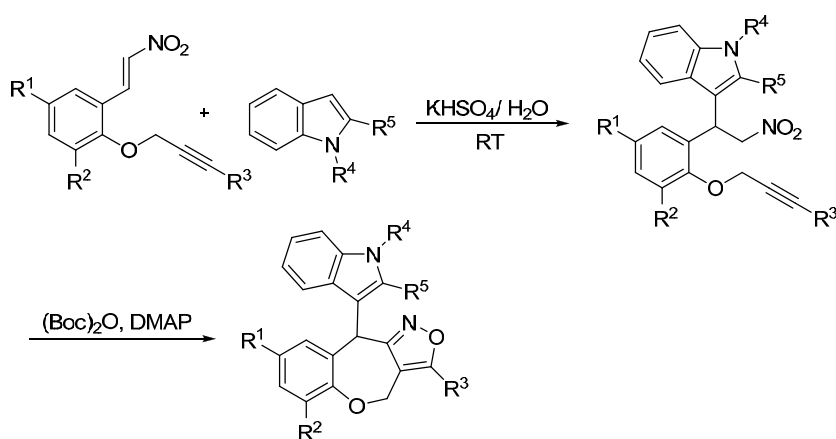


Schema 2.23 Herstellung von Nitriloxiden nach Hassner.

2.3 Synthese von Isoxazolen *via* Michael-Addition und sequentielle Nitriloxid-Cycloaddition

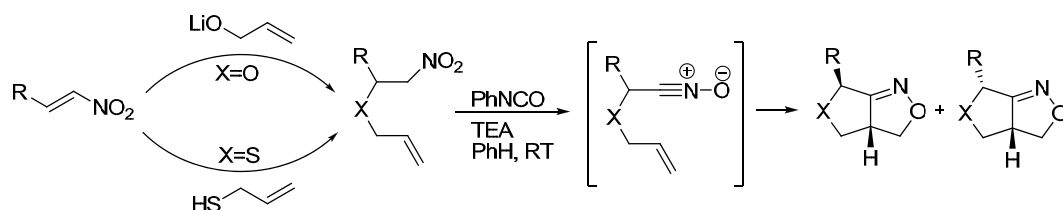
Carbocyclische, fünfgliedrige Ringe sind bedeutende Bausteine für die Synthese von Naturstoffen, wie etwa der Prostaglandinen.^[59] Eine weit verbreitete Methode zur Herstellung funktionalisierter Cyclopentanderivate ist die Umwandlung von bicyclischen Isoxazolen. Diese Isoxazolin-Ringmotive lassen sich gut über intramolekulare 1,3-dipolare Nitriloxid-Cycloadditionen (INOC), die aufgrund der Vielzahl an einsetzbaren Dipolen und Dipolarophilen ein weites Produktspektrum aufweisen, herstellen.^[60] Die Herstellung geeigneter Vorstufen für die INOC-Reaktion, ausgehend von kommerziell erhältlichen Ausgangsmaterialien, gestaltet sich allerdings meist nicht ganz einfach oder ist sehr aufwändig. Als leicht zugängliche Ausgangsverbindungen für die Cycloaddition können primäre, aliphatische Nitroverbindungen fungieren, die durch Michael-Addition von Nucleophilen an Nitroalkene erhältlich sind.^[61] Im Allgemeinen finden Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Schwefel-Nucleophile in diesen Additionen Verwendung. Stickstoff-Nucleophile hingegen werden wegen der geringen Stabilität von β -Aminonitroverbindungen nur selten eingesetzt.^[62] Eine Sequenz aus Michael-Addition gefolgt von einer Nitriloxid-Cycloaddition ermöglicht somit eine sehr effiziente Synthese von heterocyclischen, fünfgliedrigen Ringen aus Nitroalkenen.

Perumal *et al.* setzten ebenfalls Kohlenstoffnucleophile in Michael-Additionen an Nitroalkene ein, um Nitroalkan-Vorstufen für die Nitriloxid-Cycloaddition herzustellen (Schema 2.24).^[63] Ausgehend von *o*-Propargylbenzaldehyd wurden Nitroalkene synthetisiert, die mit Indolen eine Michael-Addition eingehen. Die Additions-Produkte wurden unter Verwendung der Hassner-Methode (siehe Schema 2.23) in das entsprechende Nitriloxid umgewandelt und zum Isoxazol cyclisiert.



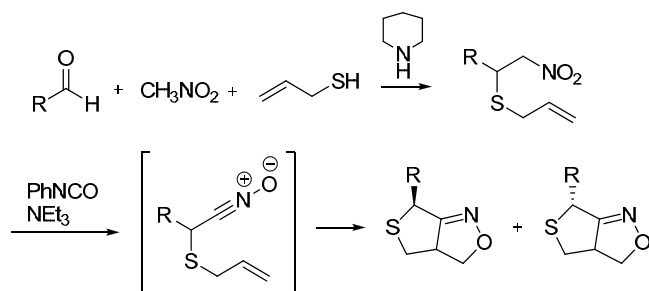
Schema 2.24 Isoxazolsynthese ausgehend von *o*-Propargylbenzaldehyd nach Perumal *et al.*

Untersuchungen von Kurth und Mitarbeitern zeigten, dass sowohl Sauerstoff- als auch Schwefelnukleophile mit verschiedenen aliphatischen und aromatischen Nitroalkenen zu den entsprechenden Michael-Produkten reagieren (Schema 2.25).^[64] Durch Michael-Addition von Lithiumallylalkoholaten an Nitroalkene wurden Nitroalkylallyl-Ether erhalten, während die analogen Thioether durch Addition von Allylmercaptan hergestellt wurden. Die isolierten Michael-Addukte wurden mit Isocyanat dehydratisiert und das so *in situ* generierte Nitriloxid intramolekular in einer 1,3-dipolaren Alken-Cycloaddition abgefangen.



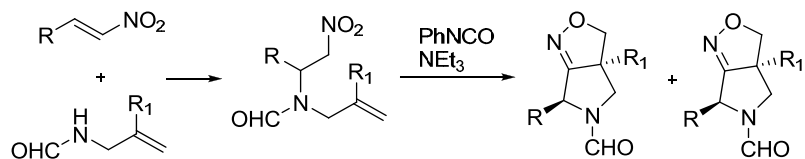
Schema 2.25 Synthese von Isoxazolen *via* Michael-Addition/Cycloaddition-Sequenz.

Auch Hassner *et al.* führten Untersuchungen zur Tandem-Michael-Addition-Cycloaddition durch.^[65] Aufbauend auf seinen Ergebnissen zur Umwandlung von α -Bromaldoximsynthonen in α -Allylamino- oder α -Allyloxyaldoxime durch Reaktion mit Allylaminen oder -alkoholen, wurden Aldehyde und Ketone mit Nitromethan in Gegenwart von ungesättigten Thiolen umgesetzt (Schema 2.26). Aus den daraus erhaltenen ungesättigten Nitroalkylsulfiden wurden anschließend über eine intramolekulare Nitriloxid-Alken-Cycloaddition Tetrahydrothiophenisoxazoline synthetisiert.



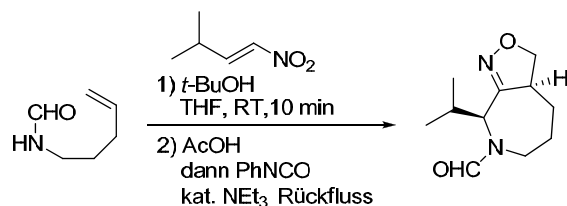
Schema 2.26 Synthese von Tetrahydrothiophenisoxazolen *via* Michael-/Cycloaddition nach Hassner.

Stickstoffnukleophile fanden ebenfalls Anwendung in Michael-Addition-Cycloaddition-Sequenzen zur Synthese von Aza-Heterocyclen.^[62] Kamimura *et al.* führten eine stereoselektive intramolekulare Nitriloxid-Cycloaddition an *N*-Allylformamiden durch (Schema 2.27). Die zu cyclisierenden *N*-Allylformamide wurden über eine Michael-Addition von Allylformamiden an Nitroalkene hergestellt. Nach Synthese der INOC-Ausgangsverbindungen und deren Umwandlung in ein Nitriloxid unter Mukaiyama-Bedingungen (Schema 2.21), erhält man in nur zwei Schritten Pyrroloisoxazoline sowie Piperidinoisoxazoline.



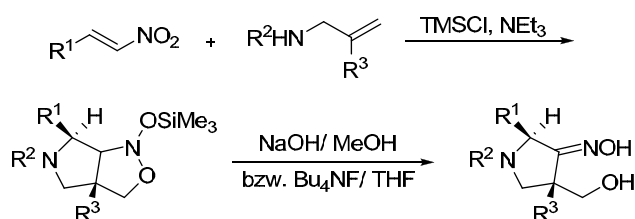
Schema 2.27 N-Nukleophile in Michael-Addition-Cycloaddition-Sequenzen zur Synthese von Aza-Heterocyclen nach Kamimura *et al.*

Die Arbeitsgruppe entwickelte diese Synthese von N-Heterocyclen konsequent weiter, in dem sie diese Sequenz in einer Eintopfsynthese von Azepinen nutzte.^[61] Hierzu wurde ein Nitroalken in Gegenwart von *t*-BuOK in einer Michael-Addition mit einem ungesättigten Formamid umgesetzt (Schema 2.28). Nach Ende der Addition wurde das Michael-Produkt mit Essigsäure hydrolysiert und anschließend mit Phenylisocyanat und Triethylamin zum Nitriloxid dehydratisiert. Unter Rückfluss fand nun die 1,3-dipolare Cycloaddition zum Azepin statt. Ausgehend von kommerziell erhältlichen Nitroalkenen und Formamiden entwickelten Kamimura *et al.* so eine Synthese von Aza-Heterocyclen in nur einem Schritt.



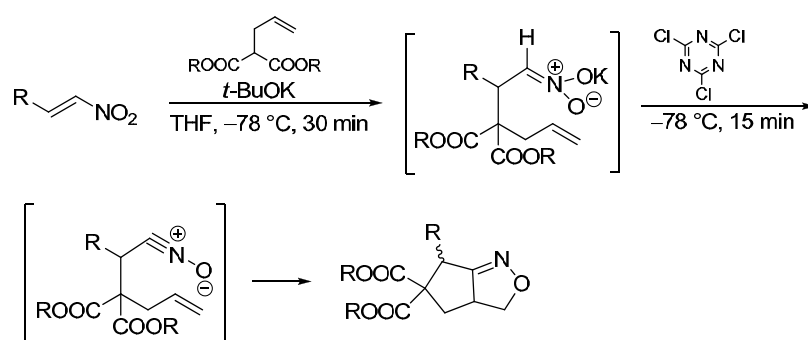
Schema 2.28 Eintopfsynthese von Aza-Heterocyclen *via* Michael-Addition/INOC nach Kamimura *et al.*

Als einer der Ersten verfasste Hassner 1995 ein Eintopfprotokoll einer Michael-Addition-Silylierung-Cycloaddition-Sequenz (Schema 2.29).^[66] Dieses Protokoll stellt einen stereospezifischen Syntheseweg für funktionalisierte Pyrrolidine dar. Ein Amin reagiert im ersten Schritt mit einem Nitroalken in einer Michael-Addition. Um die Reversibilität der 1,4-Addition zu umgehen, wurde das Michael-Produkt mit TMSCl abgefangen. Das so generierte α -Allylamino-*O*-silyl-nitronat geht eine Cyclisierung zum *N*-(Silyloxy)-isoxazolidin ein. Nach basischer Aufarbeitung bzw. Aufarbeitung mit Fluorid konnte das Pyrrolidin isoliert werden.



Schema 2.29 Eintopfprotokoll einer Michael-Addition-Silylierung-Cycloaddition-Sequenz nach Hassner.

Ein weiteres Beispiel für eine Eintopf-Umwandlung von Nitroalkenen in bicyclische Isoxazoline wurde von Yao und Mitarbeitern beschrieben (Schema 2.30).^[67] Als Nukleophil setzte diese Arbeitsgruppe α -Allylmalonsäureester in die Michael-Addition ein. Das Addukt wurde anschließend ohne Isolierung in das Nitriloxid überführt und zum Isoxazolin cyclisiert. Allerdings konnten dabei die herkömmlichen Methoden zur Nitriloxiderzeugung nach Mukaiyama (Schema 2.21), Hassner (Schema 2.23) und Shimizu (Schema 2.22) nicht verwendet werden. Diese Methoden lieferten das Isoxazolin nur in geringen Ausbeuten, sodass Yao ein neues, effizienteres Dehydratisierungsmittel entwickelte. Unter Anwendung von Cyanurchlorid, das als Aktivierungsmittel von Carbonsäuren bekannt ist, wurde das Nitronat aus der 1,4-Addition in das Nitriloxid umgewandelt.

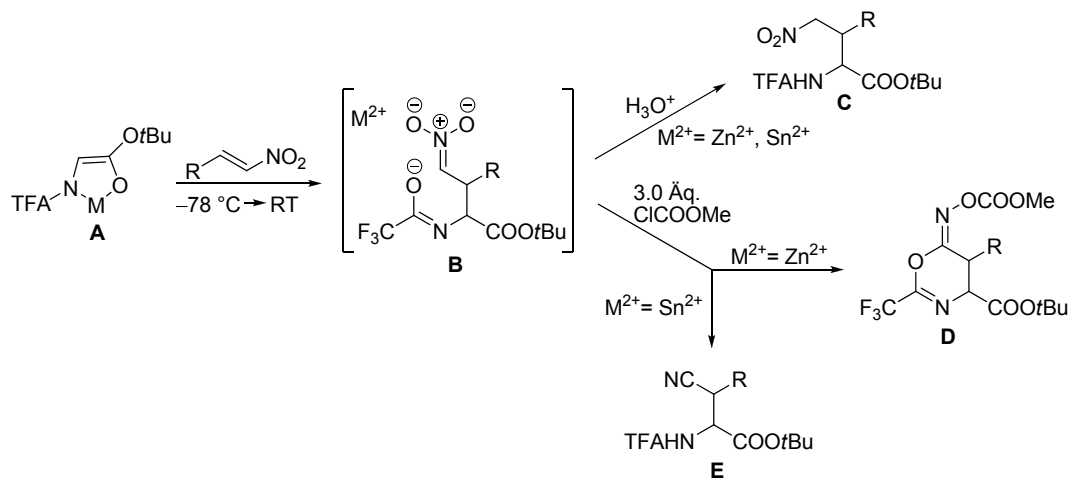


Schema 2.30 Eintopf-Umwandlung von Nitroalkenen in bicyclische Isoxazoline nach Yao und Mitarbeitern.

3 Ergebnisse und Diskussion

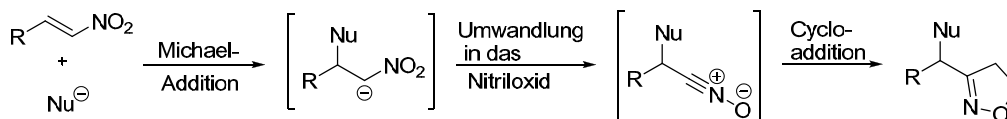
3.1 Problemstellung

Die Synthese unnatürlicher Aminosäuren zählt seit Jahren zu den Hauptforschungsgebieten des Arbeitskreises Kazmaier. Aus *N*-geschütztem Glycinester werden hochreaktive, chelatisierte Enolate erzeugt, die als reaktionsfähige Nukleophile in Aldol-Additionen, Palladium- und Rhodium-katalysierten allylischen Alkylierungen, Esterenolat-Claisen-Umlagerungen und Michael-Additionen erfolgreich eingesetzt werden konnten. Durch zweifache Deprotonierung mit Hilfe starker Lithiumamid-Basen und anschließender Zugabe entsprechender Metallsalze werden thermisch stabile Enolate **A** mit einer fixierten Enolatgeometrie erzeugt. In allen bisherigen Untersuchungen zur Michael-Addition verbrückter Enolate **A** an Nitroalkene wurden als Nukleophile Glycinesterenolate und Dipeptidesterenolate eingesetzt.^[16, 68] Nitroalkene sind hervorragende Akzeptoren für die Addition von chelatisierten Enolaten **A**, weil sie je nach Reaktions- bzw. Aufarbeitungsbedingungen ein breites Produktspektrum liefern (Schema 3.1). Zum einen kann durch Hydrolyse des gebildeten Nitronats **B** das Michael-Additionsprodukt **C** in guten Ausbeuten erhalten werden. Die Diastereoselektivitäten sind dabei abhängig vom jeweils gewählten Metallsalz. Bei Verwendung von Zinkenolaten wurde das Additionsprodukt **C** in guten Ausbeuten und mit moderater Diastereoselektivität bzw. unter Einsatz von Zinnenolaten in mäßigen Ausbeuten und hoher Diastereoselektivität erhalten.^[16] Andererseits kann das Nitronat **B** unter Verwendung von Zinkchlorid mit Acylhalogeniden oder Chloroformiaten zum Iminooxazin **D** cyclisiert werden.^[17] Im Gegensatz dazu wurde die Bildung eines Nitrils **E** beobachtet, wenn das Nitronats **B** *in situ* mit Chlorameisensäuremethylester in Anwesenheit von Zinnchlorid umgesetzt wurde.^[18] Sowohl die Reaktion des Nitronats **B** zum Iminooxazin **D** als auch die Reaktion zum Nitril **E** laufen vermutlich über ein Nitriloxid. Eine derartige Umwandlung eines Nitronats in ein Nitriloxid mit Hilfe von Chloroformiaten wurde bereits von Shimizu berichtet.^[12] Das gebildete Nitriloxid wird entweder durch Zinn zum Nitril reduziert oder intramolekular durch das deprotonierte TFA-Amid angegriffen.



Schema 3.1 Michael-Additionen chelatisierter Enolate an Nitroalkene und Folgereaktionen.

Aufbauend auf diesen Beobachtungen sollte im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche, effektive Anwendung des gebildeten Nitronats **B** aufgezeigt werden. Ziel war es, die Michael-Addition des chelatisierten Enolats mit einer *in situ* Nitriloxid-Transformation und einer anschließenden [3+2]-Cycloaddition zu kombinieren (Schema 3.2). Durch diese Eintopf-Synthese werden Isoxazolin-Aminosäurederivate leicht zugänglich gemacht. Die zu entwickelnde Dominoreaktion ermöglicht den Aufbau komplexer heterocyclischer Strukturen aus relativ einfachen Ausgangsverbindungen in nur einem Schritt. Des Weiteren sollten verschiedene Aminosäureesterderivate erzeugt werden, wobei das Dipolarophil sowohl über das Nukleophil als auch über das Nitroalken eingeführt werden sollte.

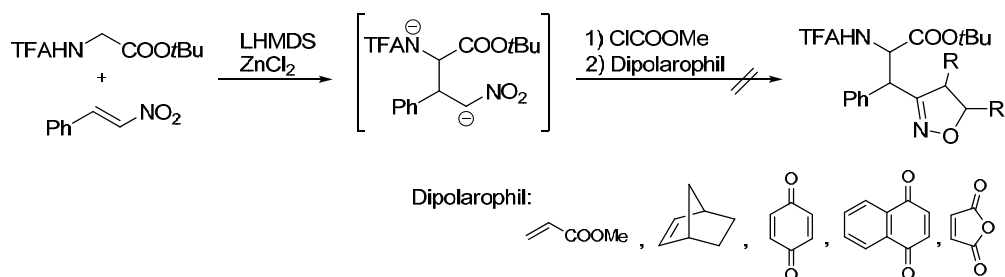


Schema 3.2 Eintopf-Synthese von Isoxazolin-Aminosäureesterderivaten.

3.2 Entwicklung der Eintopfsequenz Michael-Addition/ Nitriloxidbildung und 1,3-dipolare Cycloaddition

Anfänglich wurde versucht, das in der Michael-Addition gebildete Nitronat in das Nitriloxid zu überführen und dieses intermolekular in einer Cycloaddition abzufangen. Anhand der Beobachtungen von B. Mandler^[16, 18] wurde nach der Michael-Addition *in situ* ein Chloroformiat zugegeben, um das Nitriloxid zu generieren. Im nächsten Schritt wurde ein Dipolarophil zur Reaktionslösung getropft und so eine Huisgen-Cycloaddition ermöglicht. Die intermolekulare 1,3-dipolare Cycloaddition des *in situ* generierten Nitriloxids an ein Dipolarophil gestaltete sich allerdings schwierig. Mit einer Vielzahl verschiedener Dipolarophile wie

Maleinsäureanhydrid, *para*-Chinon, Acrylsäuremethylester, Naphtochinon und dem sehr reaktiven Norbornen konnte kein Additions-Produkt isoliert werden (Schema 3.3). Das Produkt war bestenfalls in Spuren im NMR nachweisbar. Um mögliche Nebenreaktionen aufzudecken und die einzelnen Reaktionsschritte zu überwachen, wurden Reaktionen mit verschiedenen Dipolarophilen mittels GC-Analyse verfolgt. Die Reaktionsverfolgungen zeigten, dass in der sehr komplexen Mischung der Eintopfreaktion viele verschiedene Nebenreaktionen mit der intermolekularen Cycloaddition konkurrieren.



Schema 3.3 Intermolekulare Cycloadditions-Sequenz.

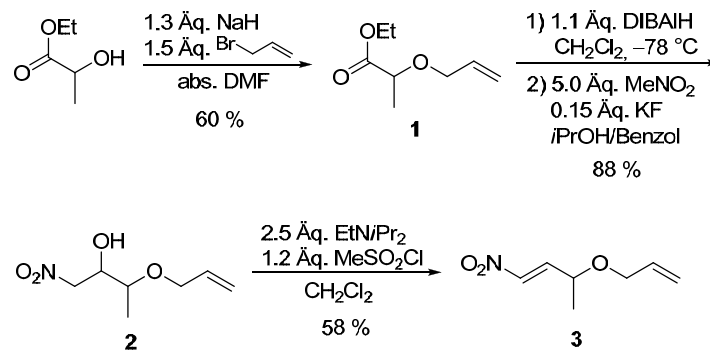
Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die intermolekulare Cycloadditions-Variante aufgrund einer Fülle an Nebenreaktionen wenig erfolgsversprechend war, wurde die intramolekulare Variante in Betracht gezogen. Die intramolekulare Cycloaddition sollte energetisch günstiger und somit schneller als die intermolekulare Cycloaddition ablaufen. Zudem zeigten u.a. Nair *et al.*,^[59, 60, 69] dass intramolekulare 1,3-dipolare Cycloadditionen sehr gut bei tiefen Temperaturen ablaufen. Durch eine intramolekulare Cycloaddition sollte es also möglich sein, die bei der intermolekularen Variante ablaufenden Nebenreaktionen zumindest teilweise zu umgehen. Das Dipolarophil kann hierbei auf zwei Wegen in das Nitronat *via* Michael-Addition eingeführt werden. Das Dipolarophil in Form einer Doppelbindung kann entweder durch das Nitroalken oder das Nukleophil bereitgestellt werden.

3.2.1 Einführung des Dipolarophils über das Nitroalken

3.2.1.1 Synthese des Nitroalkens 3

Als Erstes wurde das Dipolarophil über den Akzeptor eingeführt. Hierzu wurde eine Vorstufe synthetisiert, die sowohl eine Nitroalken als auch eine Doppelbindung trägt (Schema 3.4). Ausgehend von Milchsäureethylester wurde im ersten Schritt eine Allylierung der Alkoholfunktion mit Allylbromid und Natriumhydrid durchgeführt. Die Allylschützung mit Natriumhydrid lieferte das Produkt **1** aber nur in moderater Ausbeute. Im nächsten Schritt erfolgte eine DIBALH-Reduktion bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu dem entsprechenden Aldehyd.^[6] Letzterer wurde ohne Aufreinigung in einer Henry-Reaktion mit Nitromethan und Kaliumfluorid zur Reaktion gebracht.^[1] Die Reduktion und die Henry-Reaktion führte mit Ausbeuten von 88 % problem-

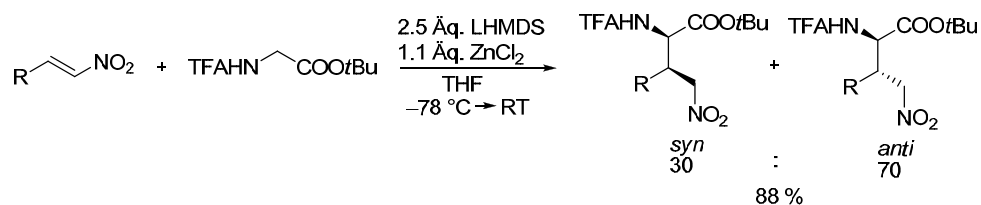
los zum β -Hydroxynitroalkan **2**. Um das Nitroalkan zu erhalten musste schließlich eine Eliminierung zur Doppelbindung erfolgen. Hierzu wurde die Hydroxygruppe des Nitroaldolproduktes **2** mit Methansulfonylchlorid in eine bessere Abgangsgruppe umgewandelt. Gleichzeitig ermöglicht die organische Base DIPEA die Eliminierung der aktivierten Hydroxygruppe.^{[1],[7]} Dieser Eliminierungsschritt verlief nur in moderaten Ausbeuten. Das gewünschte Nitroalkan **3** wurde nach vier Stufen als gelbes Öl erhalten.



Schema 3.4 Synthese eines Nitroalkens mit dipolarophiler Gruppe.

3.2.1.2 Michael-Addition an das Nitroalkan **3**

Zur Entwicklung der Dominoreaktion wurde im ersten Schritt zunächst die Michael-Addition optimiert und dann auf die Dominoreaktion übertragen. Das zuvor synthetisierte Nitroalkan **3** wurde mit *N*-Trifluoracetylglycin-*tert*-butylester unter Standardbedingungen zur Reaktion gebracht. Hierzu wurde der Glycinester bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durch Umsetzung mit einer Base deprotoniert und in Gegenwart eines Metallsalzes transmetalliert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Nitroalkens zur Enolat-Lösung. Als Grundlage für die Optimierung der Michael-Addition dienten die Arbeiten von B. Mendler.^[16, 18] Aus den Arbeiten ging hervor, dass TFA-Glycin-*tert*-butylesterenolate, die mit LHMDS deprotoniert wurden, in Gegenwart von Zinkchlorid gut an Nitroalkene addieren (Schema 3.5).

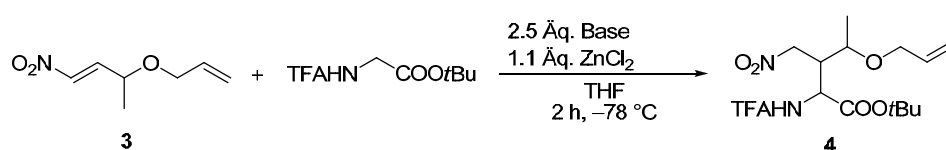


Schema 3.5 Grundlagen der Optimierung der Michael-Addition.

Bereits im ersten Versuch konnten unter Anwendung von B. Mendlers Protokoll sehr gute Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 3.1, Eintrag 1). Die Michael-Addition startete direkt nach Zugabe des Nitroalkens und war schon nach ein bis zwei Stunden beendet. Allerdings blieb ein Teil des Nitroalkens zurück. Trotz der unvollständigen Reaktion wurde das Michael-

Addukt **4** mit einer Ausbeute von 91 % gebildet (Eintrag 1). Andere Amidbasen wie LDA (Eintrag 2) und Lithium-2,2,4,4-tetra-methylpiperidid (LTMP) (Eintrag 3) lieferten vergleichbare Ergebnisse. Auch mit diesen Amidbasen wurden Ausbeuten um 90 % erzielt. In der Michael-Addition wurden von vier möglichen Stereoisomeren zwei bevorzugt (85 %, aus NMR) als eine 1:1-Diastereomerenmischung gebildet. Anhand der Beobachtungen von B. Mendler^[70] wurde vermutet, dass das Verhältnis von 85:15 der simplen Diastereoselektivität (*syn/anti*) entsprach. Die induzierte Diastereoselektivität kann offensichtlich vernachlässigt werden.

Tabelle 3.1 Michael-Addition des synthetisierten Nitroalkens **3**.

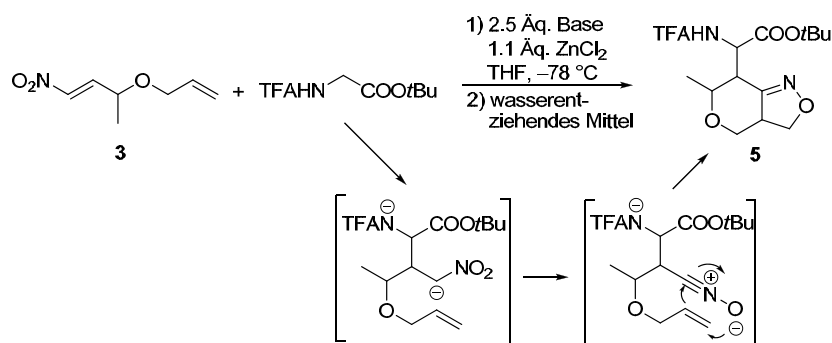


	Base	Ausbeute [%]
1	LHMDS	91
2	LDA	89
3	LTMP	94

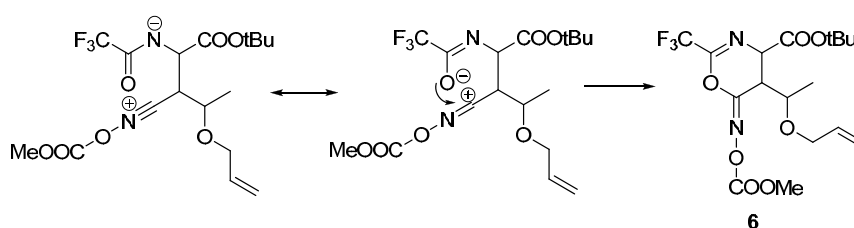
3.2.1.3 Dominoreaktion *via* Michael-Addition/Nitriloxidbildung/1,3-dipolare Cycloaddition des Nitriloxids an die Doppelbindung des Nitroalkens **3**

Nachdem die Michael-Addition an das synthetisierte Nitroalken **3** mit sehr guten Ausbeuten verlief (3.2.1.2, Tabelle 3.1), wurden jetzt Untersuchungen der Dominoreaktion durchgeführt. Durch *in situ* Zugabe eines wasserentziehenden Mittels nach Abklingen der Michael-Addition wurde ein Nitriloxid generiert, welches anschließend spontan mit der Doppelbindung des Nitroalkens **3** cyclisieren sollte. Als erstes wasserentziehendes Mittel wurde Methylchloroformiat (Tabelle 3.2) eingesetzt, das sich in der Michael-Addition/Iminooxazin-Bildung^[17] bewährt hat.

Obwohl ein Äquivalent ausreichend für die Nitriloxidbildung war, wurden mit 1.2 Äquivalenten des Methylchloroformiats lediglich 13 % des erwarteten [3+2]-Cycloadditionsproduktes **5** erhalten (Tabelle 3.2, Eintrag 1). Als Hauptprodukt lieferte diese Reaktion das entsprechende Iminooxazin **6**. Mit einem größeren Überschuss an Chlorameisensäuremethylester (3.0 Äquivalente) wurde ausschließlich das Iminooxazin **6** in mäßigen Ausbeuten gebildet (Tabelle 3.2 Eintrag 2, Schema 3.6). Dieses Reaktionsverhalten zeigt, dass die Acylierung des Nitriloxides schneller als die Cycloaddition verläuft (Schema 3.6).^[70] Das acylierte Nitriloxid wird anschließend durch das deprotonierte TFA-Amid intramolekular nukleophil angegriffen, so dass eine Cyclisierung zum Heterocyclus erfolgt.

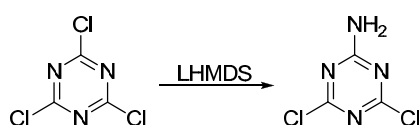
Tabelle 3.2 Dominoreaktion von TFA-Glycin-*tert*-butylester mit Nitroalken 3.

	Base	Wasserentziehendes Mittel	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
1	LHMDS	1.2 Äq ClCOOMe	MA: 2 h, -78 °C CA: ü.N., -78 °C → RT	13 (25 Iminooxazin 6)
2	LHMDS	3.0 Äq ClCOOMe	MA: 2 h, -78 °C CA: ü.N., -78 °C → RT	--- (40 Iminooxazin 6)
3	LHMDS	2.2 Äq Ph-N=C=O	MA: 2 h, -78 °C CA: ü.N., -78 °C → RT	Spuren
4	LHMDS	3.0 Äq TCT	MA: 2 h, -78 °C CA: ü.N., -78 °C → RT	72
5	LHMDS	3.0 Äq TCT	MA: 2 h, -78 °C CA: 3h, -78 °C	69
6	LHMDS	3.0 Äq TCT	MA: 2 h, -78 °C CA: 1h, -78 °C	49
7	LHMDS	1.2 Äq TCT	MA: 2 h, -78 °C CA: 3h, -78 °C	25
8	LHMDS	2.2 Äq TCT	MA: 2 h, -78 °C CA: 3h, -78 °C	32
9	LHMDS	3.0 Äq TCT	MA: 2 h, -78 °C CA: ü.N, 0 °C → RT	Spuren
10	LDA	3.0 Äq TCT	MA: 2 h, -78 °C CA: 3h, -78 °C	91
11	LTMP	3.0 Äq TCT	MA: 2 h, -78 °C CA: 3h, -78 °C	94



Schema 3.6 Schematische Darstellung der Iminooxazinbildung.

Nachdem sich Chlorameisensäuremethylester in dieser Reaktion nicht bewähren konnte, wurde das weitverbreitete Mukaiyama-Reagenz Phenylisocyanat (Tabelle 3.2, Eintrag 3) verwendet.^[11] Auch die Anwendung der Mukaiyama-Bedingungen verlief unbefriedigend. Das gewünschte Produkt **5** wurde nur in Spuren gebildet. Erst der Einsatz von Cyanurchlorid (2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazin, TCT) führte zu guten Ergebnissen.^[67] Wenn die Michael-Addition mit 3.0 Äquivalenten TCT bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gequenchet und über Nacht auf RT erwärmt wurde, konnte das erwartete Cycloadditionsprodukt **5** in guter Ausbeute isoliert werden (Tabelle 3.2, Eintrag 4). Im nächsten Schritt wurde versucht, die Reaktionszeit der Nitriloxidbildung und der Cycloaddition zu verringern. Bei einer Reaktionszeit von drei Stunden ließ sich das oben geschilderten Ergebnis (Tabelle 3.2, Eintrag 5) reproduzieren, während die Ausbeute bei einer nur einstündigen Reaktionszeit stark einbrach (Tabelle 3.2, Eintrag 6). Im Anschluss an die Verringerung der Reaktionszeit, wurde nun versucht die eingesetzte Menge an Cyanurchlorid zu reduzieren. Theoretisch sollte ein Äquivalent Cyanurchlorid ausreichen, um das Nitriloxid aus dem Nitronat zu erzeugen. Dennoch sank die Ausbeute bei Verwendung von weniger als drei Äquivalenten TCT dramatisch (Tabelle 3.2, Eintrag 7 und 8). Mukaiyama und Shimizu beschrieben die effektive Nitriloxidbildung zwischen $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.^[11, 12] Durch Anwendung dieser Bedingungen auf die zu entwickelnde Dominoreaktion wurden bessere Ausbeuten erhofft. Hierzu wurde das Reaktionsgemisch nach beendeter Michael-Addition auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt, bei dieser Temperatur das Nitriloxid generiert und zur Cycloaddition anschließend über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt (Tabelle 3.2, Eintrag 9). Jedoch lieferte diese Prozedur das Isoxazolin **5** nur in Spuren. Wie vorher gezeigt (Tabelle 3.2, Eintrag 4), findet die Nitriloxidbildung schon bei sehr niedrigen Temperaturen statt. Bei Temperaturen um $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das reaktive Nitriloxid ebenfalls gebildet, aber die Nebenreaktionen dieser Umsetzung schienen stark zuzunehmen. Aufgrund der vermehrten Nebenreaktionen wurde das Cycloadditionsprodukt kaum gebildet. Die Reaktionsführung bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwies sich somit als weitaus günstiger. Eines der Nebenprodukte resultierte aus der Reaktion des Cyanurchlorid mit der Base LHMDS (Schema 3.7). Um diese unerwünschte Nebenreaktion zu unterdrücken, wurde, aufbauend auf den guten Ergebnissen der Michael-Addition, LHMDS gegen LDA (Tabelle 3.2, Eintrag 10) bzw. LTMP (Tabelle 3.2, Eintrag 11) ausgetauscht. Mit diesen Basen konnte die Ausbeute auf über 90 % gesteigert werden. Im Gegensatz zu LHMDS sind diese Amidbasen nicht in der Lage mit Cyanurchlorid zu reagieren. Somit wirkt Cyanurchlorid ausschließlich als wasserentziehendes Mittel und die Ausbeute des Isoxazolins **5** ließ sich signifikant steigern.



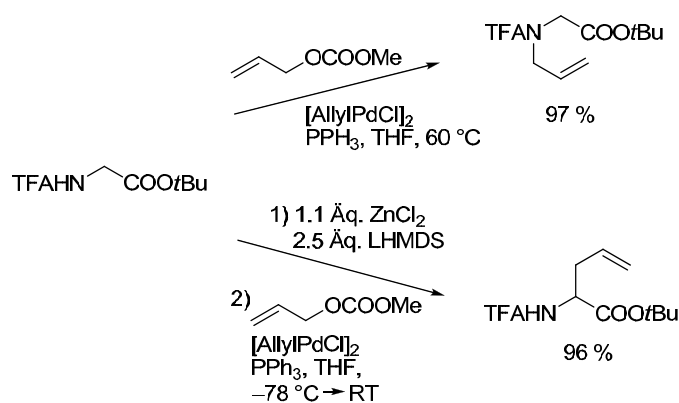
Schema 3.7 Nebenreaktion von LHMDS mit Cyanurchlorid.

3.2.2 Einführung des Dipolarophils über das Nukleophil

Alternativ kann die Doppelbindung als Dipolarophil über das Nukleophil in das Nitronat eingeführt werden. Dies kann durch Einsatz allylierter Glycinester erfolgen. Zwei mögliche allylierte Glycinester wurden betrachtet: der *N*-allylierte und *C*-allylierte Glycinester. Je nachdem, welches Nukleophil verwendet wird, können zwei ganz unterschiedliche Isoxazolin-Aminosäurederivate synthetisiert werden.

3.2.2.1 Synthese der entsprechenden allylierten Nukleophile

Beide allylierten Glycinester sind leicht aus *N*-Trifluoracetylierten Glycinestern durch Palladium-katalysierte allylische Alkylierung zugänglich (Schema 3.8).^[71, 72] Durch Behandeln des *N*-geschützten Glycin-*tert*-butylester mit Allylcarbonat in Anwesenheit von Allylpalladiumchlorid/ PPh_3 wurde das *N*-allylierte Produkt in fast quantitativer Ausbeute erhalten. Bei dieser Reaktion wird während der Bildung des π -Allylkomplexes Methanolat aus der Abgangsgruppe, dem Methylcarbonat, freigesetzt. Dieses Methanolat deprotoniert das acide TFA-Amid, so dass das eigentliche Nukleophil, welches die Allylierung eingeht, erhalten wird. Damit ausschließlich das *C*-allylierte Produkt gebildet wird, muss der TFA-Glycinester zuerst in das chelatisierte Enolat umgewandelt werden. Hierfür ist Methanolat zu schwach basisch. Aufgrund der Chelatisierung wird das TFA-Amid geschützt, so dass die Allylierung nur am Enolat stattfinden kann. Auch der *C*-allylierte Glycinester wurde in sehr guten Ausbeuten erhalten.

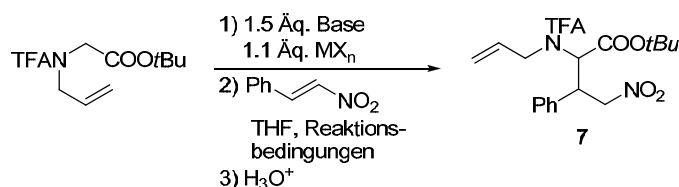


Schema 3.8 Synthese der allylierten Glycinester.

3.2.2.2 Michael-Addition des *N*-allylierten Nukleophils

Auch in diesem Fall wurde zuerst die Michael-Addition des *N*-Allyl-Glycinesters einzeln untersucht. Aufgrund des Allylrestes am Stickstoffatom sollte dieses Pro-Nukleophil nicht mehr in der Lage sein, einen Chelatkomplex auszubilden. Aus diesem Grund wurde die Michael-Addition zuerst ohne Zusatz eines Metallsalzes durchgeführt (Tabelle 3.3, Eintrag 1). Das entstandene Lithiumenolat lieferte das Additions-Produkt jedoch nur in moderaten Ausbeuten. Die Ausbeute konnte durch Halten der Reaktion bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ geringfügig gesteigert werden (Eintrag 2). Da das Lithiumenolat nur moderate Ausbeuten lieferte, wurde die Reaktion trotz des fehlenden Vermögens, ein chelatisiertes Enolat auszubilden, in Anwesenheit von Zinkchlorid durchgeführt (Eintrag 3 und 4). Unter Verwendung von Zinkchlorid konnte die Ausbeute auf 68 % erhöht werden. Aufgrund des positiven Effektes von Zinkchlorid wurden weitere Metallsalze in der Reaktion getestet. Sowohl in Anwesenheit von Zinnchlorid (Eintrag 5) als auch von Titan-tetra-*isopropoxid* (Eintrag 6) brach die Ausbeute dramatisch ein. In beiden Fällen wurde das Michael-Addukt **7** nur in Ausbeuten unter 20 % gebildet. In Hinblick auf die vorherigen Erfahrungen aus der Michael-Addition und der Dominoreaktion des Nitroalkens **3** (Tabelle 3.1, Tabelle 3.2) wurde zum Schluss auch noch die Base variiert. Allerdings lieferten die Basen LDA (Eintrag 7) und LTMP (Eintrag 8) das Produkt **7** nur in Ausbeuten zwischen 31 und 37 %. Die weitaus besten Ergebnisse konnten also durch Deprotonierung des Pro-Nukleophils mit LHMDS in Anwesenheit von Zinkchlorid erreicht werden.

Tabelle 3.3 Michael-Addition des *N*-Allyl-Glycinesters mit β -Nitrostyrol.

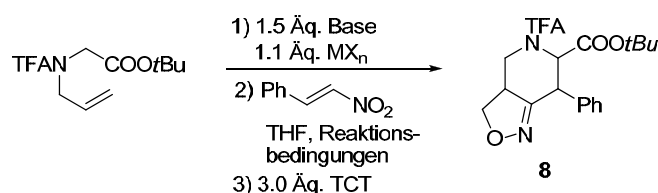


	Base	MX _n	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
1	LHMDS	---	ü.N., $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$	43
2	LHMDS	---	2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	50
3	LHMDS	ZnCl ₂	ü.N., $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$	68
4	LHMDS	ZnCl ₂	2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	65
5	LHMDS	SnCl ₂	2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	10
6	LHMDS	Ti(O <i>i</i> Pr) ₄	2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	16
7	LDA	ZnCl ₂	2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	37
8	LTMP	ZnCl ₂	2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	31

3.2.2.3 Dominoreaktion *via* Michael-Addition/Nitriloxidbildung/1,3-dipolare Cycloaddition des Nitriloxids mit der *N*-Allyl-Doppelbindung des Nukleophils

Nach der Optimierung der Michael-Addition (3.2.2.2) wurde die Dominoreaktion des *N*-Allylglycinesters entwickelt. Aus der Michael-Addition ging hervor, dass Lithium- und Zink-enolate, die durch die Base LHMDS generiert wurden, die besten Ergebnisse lieferten (Tabelle 3.3). Somit wurden diese Bedingungen nun auf die Dominoreaktion übertragen. Auch in diesem Fall erwies sich Chlorameisensäuremethylester ungeeignet als wasserentziehendes Mittel. Unter Verwendung dieses Chloroformiats wurden nur Spuren des Cycloadditions-Produkts **8** gebildet. Erst durch Einsatz von Cyanurchlorid konnte das Cycloadditions-Produkt **8** erfolgreich isoliert werden. Sowohl das Lithium- (Tabelle 3.4, Eintrag 1) als auch das Zinkenolat (Eintrag 2) lieferten das Isoxazolin **8** in akzeptablen Ausbeuten von 41–46 %. Die Reaktionstemperatur zeigte dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktion. Wurde die Cycloaddition für zwei Stunden auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten statt sie über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen zu lassen, konnten in der Dominoreaktion vergleichbaren Ergebnissen (Eintrag 3 und 4) erzielt werden.

Tabelle 3.4 Domino-Michael-Addition/Cycloaddition des *N*-Allyl-Glycinesters.

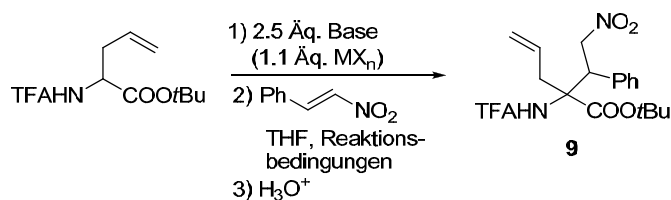


	Base	(ZnCl ₂)	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
1	LHMDS	---	MA: ü.N, $-78\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$ CA: ü.N, $-78\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$	46
2	LHMDS	ZnCl ₂	MA: ü.N, $-78\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$ CA: ü.N, $-78\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$	41
3	LHMDS	---	MA: 2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ CA: 2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	48
4	LHMDS	ZnCl ₂	MA: 2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ CA: 2 h, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$	44

3.2.2.4 Michael-Addition des C-allylierten Nukleophils

Als Nächstes wurde das Reaktionsverhalten des C-Allyl-Glycinesters untersucht. Im ersten Schritt wurde erneut die Michael-Addition optimiert, so dass die besten Bedingungen auf die Dominoreaktion übertragen werden konnten. Anfänglich bereitete die Michael-Addition Probleme und eine Produktisolierung war nicht möglich. Grund hierfür war die Deprotonierung des Aminosäureesters mit LHMDS. Das tertiäre Zentrum des Pro-Nukleophils lässt sich bedeutend schlechter deprotonieren als das Zentrum des Glycinesters. Um dem entgegen zu wirken, wurde die Zeit für die Bildung des Enolates von 10 min auf zwei Stunden verlängert. Unter diesen Bedingungen konnte das Michael-Produkt **9** in beachtlichen Ausbeuten isoliert werden. Hierbei brachte das Lithiumenolat (Tabelle 3.5, Eintrag 1), verglichen mit dem Zinkenolat (Eintrag 2) leicht bessere Ausbeuten hervor. Interessanterweise wurde bei Verwenden des entsprechenden Zinnenolates (Eintrag 3) kein Michael-Addukt **9** erhalten. Im nächsten Schritt sollte durch Einsatz stärkerer Basen als LHMDS die Ausbeute gesteigert werden. Unter Verwendung der stärkeren Basen LDA und LTMP konnte die Zeit für die Enolatbildung drastisch auf 10 min verringert werden. Zusätzlich konnte ein signifikanter Anstieg der Ausbeute beobachtet werden (Eintrag 4, 5 und 6). Vorallem das Zinkenolat in Kombination mit LTMP lieferte das Michael-Addukt **9** in hervorragender Ausbeute von 95 % (Eintrag 6).

Tabelle 3.5 Michael-Addition des C-Allyl-Glycinesters mit β -Nitrostyrol.

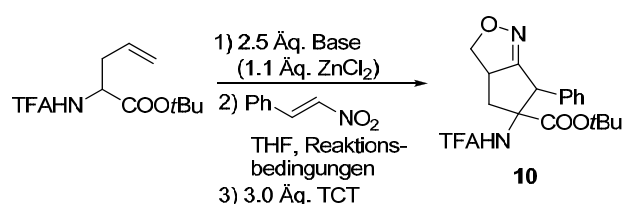


	Base	MX _n	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
1	LHMDS	---	ü.N., -78 °C → RT	65
2	LHMDS	ZnCl ₂	ü.N., -78 °C → RT	56
3	LHMDS	SnCl ₂	ü.N., -78 °C → RT	---
4	LDA	---	2 h, -78 °C	58
5	LDA	ZnCl ₂	2 h, -78 °C	79
6	LTMP	ZnCl ₂	2 h, -78 °C	95

3.2.2.5 Dominoreaktion *via* Michael-Addition/Nitriloxidbildung/1,3-dipolare Cycloaddition des Nitriloxids mit der C-Allyl-Doppelbindung des Nukleophils

Die zuvor optimierten Bedingungen (3.2.2.4) der Michael-Addition des C-Allyl-Glycinesters mit β -Nitrostyrol wurden nun auf die Dominoreaktion übertragen. Cyanurchlorid überzeugte in der Dominoreaktion des Nitroalkens **3** (3.2.1.3) und des N-Allyl-Glycinesters (3.2.2.3) und fand deshalb auch in diesem Fall Anwendung als wasserentziehendes Mittel. Zu Beginn wurde zur Deprotonierung des N-Allyl-Glycinesters LHMDs als Base verwendet. Unter Verwendung von LHMDs wurde das Cycloadditionsprodukt **10** jedoch nur in moderaten Ausbeuten erhalten. Hierbei ergab sich bei der Reaktion des Lithiumenolates (Tabelle 3.6, Eintrag 1) kein Unterschied im Vergleich zum Zinkenolate (Eintrag 2) hinsichtlich der Ausbeute. Die moderaten Ausbeuten waren jedoch unerwartet, da die Cyclisierung zum Isoxazolin **10** aufgrund des Thorpe-Ingold-Effektes^[73] stark begünstigt sein sollte. Entsprechend dem Thorpe-Ingold-Effekt lassen sich geminal disubstituierte Verbindungen sehr gut cyclisieren. Durch geminale Disubstitution des Kohlenstoffatoms wird der Bindungswinkel zwischen den beiden Substituenten komprimiert, die zu cyclisierenden Substituenten rücken näher auf einander zu und die Cyclisierung wird erleichtert. Da sich die Verwendung von stärkeren Basen in der Michael-Addition des N-Allyl-Glycinesters bewährt hat, wurde ein Basenwechsel von LHMDs auf LDA und LTMP vollzogen. Durch den Basenwechsel konnte die Ausbeute der Dominoreaktion signifikant gesteigert werden (Eintrag 3 und 4). Während LTMP das Cyclisierungsprodukt **10** in einer Ausbeute von 54 % lieferte, konnte die Ausbeute durch Einsatz von LDA auf 76 % gesteigert werden.

Tabelle 3.6 Domino-Michael-Addition/Cycloaddition des C-Allyl-Glycinesters.



	Base	(ZnCl ₂)	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
1	LHMDS	---	MA: 2 h, -78 °C CA: 3 h, -78 °C	40
2	LHMDS	ZnCl ₂	MA: 2 h, -78 °C CA: 3 h, -78 °C	38
3	LDA	ZnCl ₂	MA: 2 h, -78 °C CA: 3 h, -78 °C	76
4	LTMP	ZnCl ₂	MA: 2 h, -78 °C CA: 3 h, -78 °C	54

Teil B

Entwicklung und Anwendung von 7-Dialkyl-Aminocumarin- Fluoreszenz-Labels

4 Einleitung

Neben der Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese ist in der modernen Naturstoffforschung vor allem die Kenntnis der molekularen Angriffsziele und der Wirkungsmechanismen von zentralem Interesse. Soll ein Naturstoff als Arzneimittel für eine bestimmte Krankheit entwickelt und zugelassen werden, ist es wichtig, den genauen Wirkort und auch alle weiteren möglichen Angriffsziele in der Zelle aufzuklären, die zu möglichen Nebenwirkungen führen können.^[74] Hierzu wurde in den letzten 20 Jahren vermehrt die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Diese extrem sensitive und selektive Technik erlaubt durch Fluoreszenzmarkierung von Biomolekülen die Beobachtung und Aufzeichnung des Verlaufs von molekularen oder zellulären Prozessen für die biochemische, biologische, diagnostische oder therapeutische Anwendung.^[75] Durch dieses biomolekulare *Imaging* können Wirkungsmechanismen und Targets identifiziert werden und somit Ansatzpunkte für die Medikamentenentwicklung gefunden werden.

Ein für die Medikamentenentwicklung interessantes Biomolekül – für das in den letzten zehn Jahren zahlreiche Markierungsmethoden entwickelt wurden – ist das Protein.^[76] Proteine spielen eine herausragende Rolle im menschlichen Organismus.^[77] Sie stellen als Gerüstbaustein von Zellen ein entscheidendes Strukturelement für den Aufbau von Geweben dar und fungieren als Transportsystem im Metabolismus. Weiterhin zeigen Peptide Signal- und Regulationsfunktionen in Form von Hormonen oder spielen als Enzym eine unerlässliche Rolle für den Stoffwechsel. Ideale Fluorophore zur Fluoreszenz-Derivatisierung von Proteinen sind Cumarinfarbstoffe.^[78, 79] Besonders der Einsatz von 7-Dialkylamino-Cumarinen hat sich wegen ihrer geringen pH-Abhängigkeit und exzellenten Fluoreszenzquantenausbeute bewährt.

Mit Hilfe eines 7-Dialkyl-Aminocumarins, welches als *false fluorescent neurotransmitter* fungierte, konnten Gubernator et al. beispielsweise die Dopamin-Sekretion an individuellen präsynaptischen Terminals untersuchen (Abbildung 4.1).^[80] Dieser synthetische Neurotransmitter ist auch für die Physiologie-Arbeitsgruppe von Prof. Jens Rettig, Universitätsklinikum Homburg, von Interesse. Die Gruppe beschäftigt sich mit der Aufklärung von molekularen

Mechanismen der synaptischen Transmission. Ziel hierbei ist das Verständnis, wie die Kommunikation zwischen Nervenzellen herbeigeführt und angepasst wird. Die Arbeitsgruppe studiert hierzu Vorgänge an individuellen Synapsen, wie z.B. die Rolle von Sekundärbotenstoffen in der Regulation der Chromaffinzellen-Sekretion,^[81] und erhofft sich durch die Übertragung des erlangten Wissens auf komplexere Netzwerke, wie das Gehirn, mögliche Strategien zur Behandlung von Erkrankungen des Zentralnervensystems zu identifizieren. Da die Synthese des *false fluorescent neurotransmitter* nicht literaturbekannt war, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, diesen für das molekulare *Imaging* von Adrenalin in Chromaffinzellen zu synthetisieren und zu optimieren.

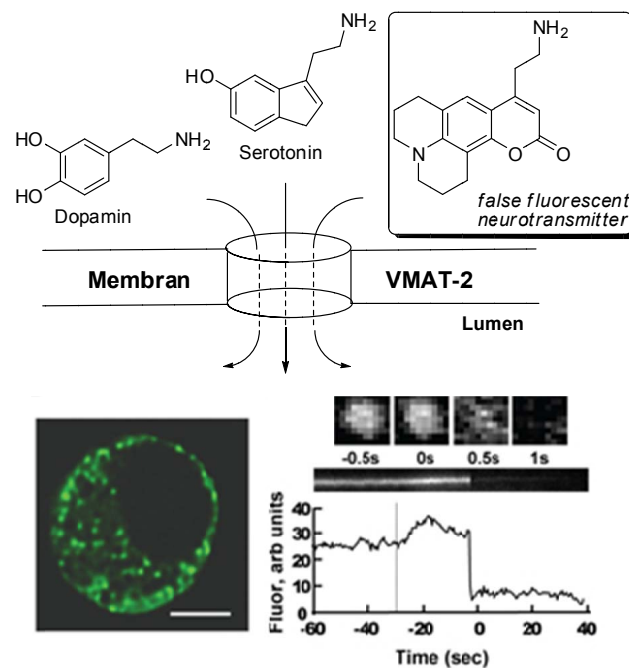
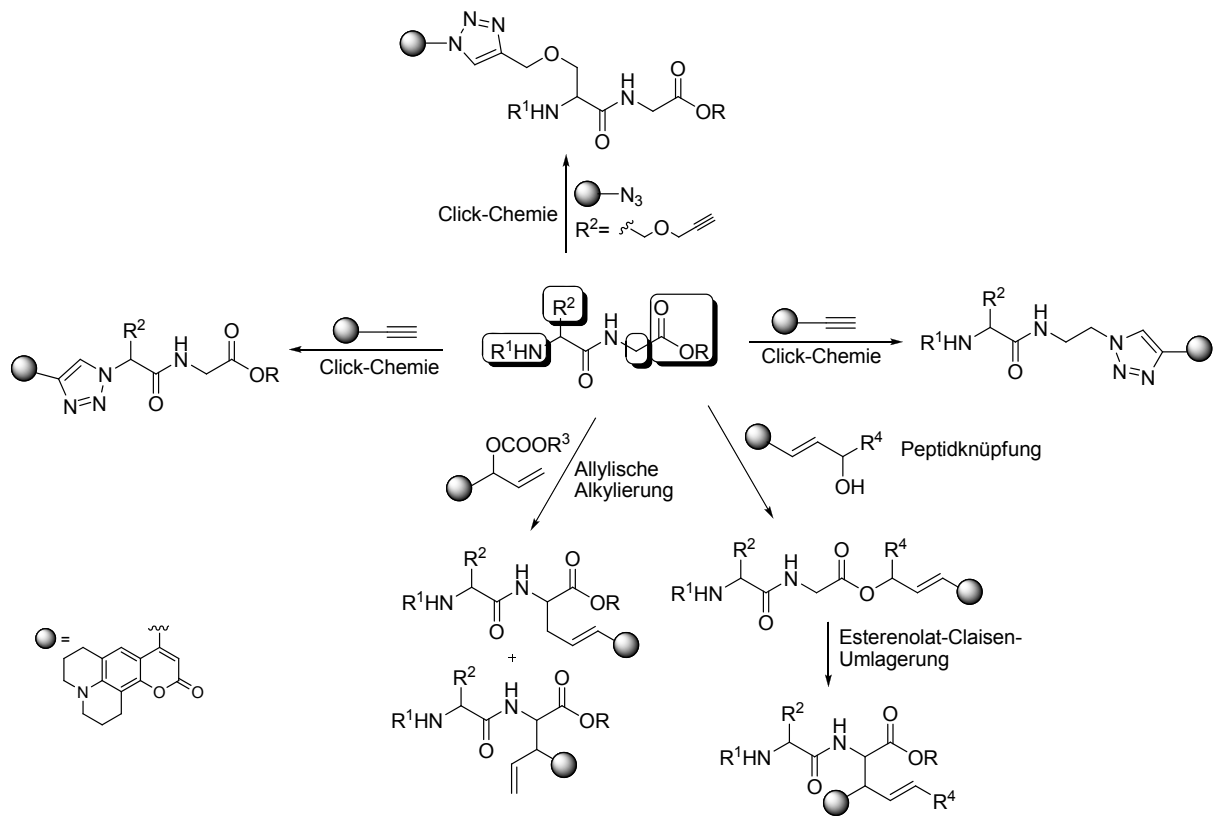


Abbildung 4.1 Untersuchung der Dopamin-Sekretion mit Hilfe eines *false fluorescent neurotransmitter* nach Gubernator *et al.*

Ein weiteres Ziel war es, Fluoreszenz-Labels für bioorthogonale Fluoreszenz-Markierungs-Strategien von Aminosäuren und Peptide zu entwickeln (Schema 4.1). Hierbei bestand eine Aufgabe in der Synthese von neuen 7-Aminocumarinbasierten Fluoreszenz-Labels zur Modifizierung *via* Azid-Alkin-Click-Chemie. Die Labels sollten dabei die Markierung von Aminosäuren und Peptiden an unterschiedlichen Positionen ermöglichen. Desweiteren sollten Techniken zur Markierung von Aminosäuren ohne Funktionalität in der Seitenkette entwickelt werden. Durch Anwendung der Palladium-katalysierten allylischen Substitution und der Esterenolat-Claisen-Umlagerung sollten Fluorophore am Rückgrat angebracht werden.



Schema 4.1 In der Arbeit zu entwickelnde Markierungstechniken.

5 Kenntnisstand

5.1 Grundlagen der Fluoreszenz

In den letzten 20 Jahren hat die Fluoreszenzmikroskopie in den Biowissenschaften Einzug gehalten. Die Fluoreszenzmikroskopie gehört heute zu den dominierenden Methoden in der Biotechnologie, der medizinischer Diagnostik, der Sequenzierung von DNA und der Forensik.^[82] Als Fluoreszenz bezeichnet man das optische Phänomen bestimmter Substanzen, unter elektromagnetischer Bestrahlung kurzzeitig Licht längerer Wellenlänge auszusenden.^[79, 83] Wird einem Molekül Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung zugeführt, so wird diese Energie im Molekül je nach Energiegehalt auf unterschiedliche Weise in eine andere Energieform umgewandelt. Während die elektromagnetischer Strahlung niedriger Energie, wie Mikrowellen oder Infrarotstrahlung, in mechanische Energie, in Rotationsbewegungen und Schwingungen des Moleküls umgewandelt wird, werden bei Einwirkung energiereicher Strahlung Elektronen aus ihren Orbitalen herausgelöst und in leere unbesetzte Orbitale mit höherem Energiegehalt gehoben. Fallen die Elektronen von dort in ihr ursprüngliches Orbital zurück, kann die freiwerdende Energie wieder als Licht emittiert werden. Die Prozesse, die zwischen Absorption und Emission des Lichts ablaufen, lassen sich anhand des Jablonski-Diagramms (Abbildung 5.1) veranschaulichen. Der angeregte Zustand S_1 ist energetisch ungünstig und nicht stabil, so dass das Elektron schon nach 10^{-8} s wieder in den Grundzustand S_0 zurückfällt. Besitzt das anregende Photon viel Energie, kann das Molekül auch direkt in höhere Energieniveaus S_2 , S_3 , usw. gelangen. Jedoch verliert dieses Molekül nach weniger als 0.1 ns den Überschuss an Schwingungsenergie und fällt strahlungslos auf das niedrigste Energieniveau des angeregten Zustandes zurück (Interne Konversion).

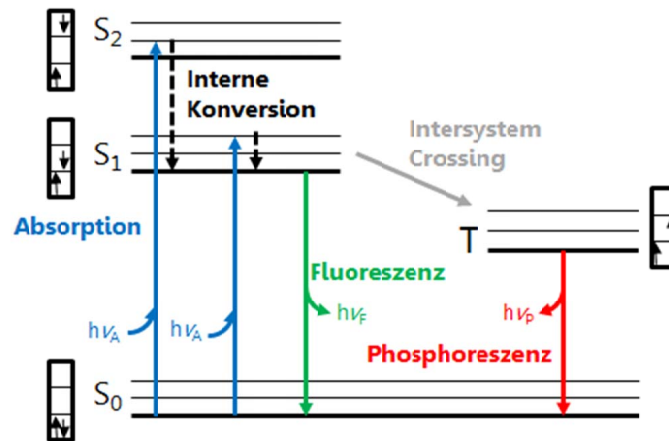


Abbildung 5.1 Jablonski-Diagramm.

Es bestehen zwei Möglichkeiten, von einem angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 zurückzugelangen. Das Molekül kann durch strahlungslose Übergänge, bei denen die Moleküle durch Stöße die gesamte Energie an ihre Umgebung abgeben, oder durch Lumineszenz in den Grundzustand S_0 zurückfallen. Das Phänomen der Lumineszenz wird abhängig vom Anregungszustand in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Beim Phänomen der Phosphoreszenz geht das Molekül strahlungslos durch Singulett-Triplett-Umwandlung (*Intersystem crossing*) vom Singulettzustand S in den Triplettzustand T über. Diese Umwandlung ist optisch verboten, da es zur Elektronenspinumkehr kommt. Durch Phosphoreszenz kehrt das Molekül schließlich aus dem Triplett- T in den Grundzustand S_0 zurück. Die Phosphoreszenzlebensdauer beträgt Millisekunden bis Sekunden. Bei der Fluoreszenz fällt das Elektron direkt in den Grundzustand S_0 zurück. Dabei findet keine Spinumkehr statt und Licht einer charakteristischen Wellenlänge wird emittiert. Die Fluoreszenzlebensdauer – die Zeit zwischen Anregung und Rückfall in den Grundzustand – beträgt etwa 10 ns. Während dieser kurzen Zeit finden physikalische Vorgänge wie Rotation, Schwingung, Komplexbildung, Protonenaustausch oder Energieübertragung statt, die die Fluoreszenz beeinträchtigen. Diese Beobachtung machte George Gabriel Stokes 1852. Stokes erkannte die Gesetzmässigkeit, dass das von fluoreszierenden Stoffen wieder emittierte Licht eine größere Wellenlänge hat als das vom Stoff absorbierte Licht. Ein Teil der Energie geht durch Schwingungsrelaxation verloren, was eine langwellige Verschiebung des emittierten Lichtes verursacht (Stokes-Shift, Abbildung 5.2). Der Stokes-Shift ist als Differenz der Energie zwischen ein- und ausgehenden Photon definiert. Eine weitere wichtige Größe bei der Fluoreszenz ist die Fluoreszenzquantenausbeute. Die Quantenausbeute beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der die Anregung eines Fluorophors tatsächlich zur Emission eines Fluoreszenzphotons führt. Wird für jedes absorbierte Photon auch wieder ein Photon emittiert, so ist die Quantenausbeute $\Phi=1$ (bzw. 100 %). Diese theoretische Obergrenze wird nur von wenigen Molekülen annähernd erreicht.

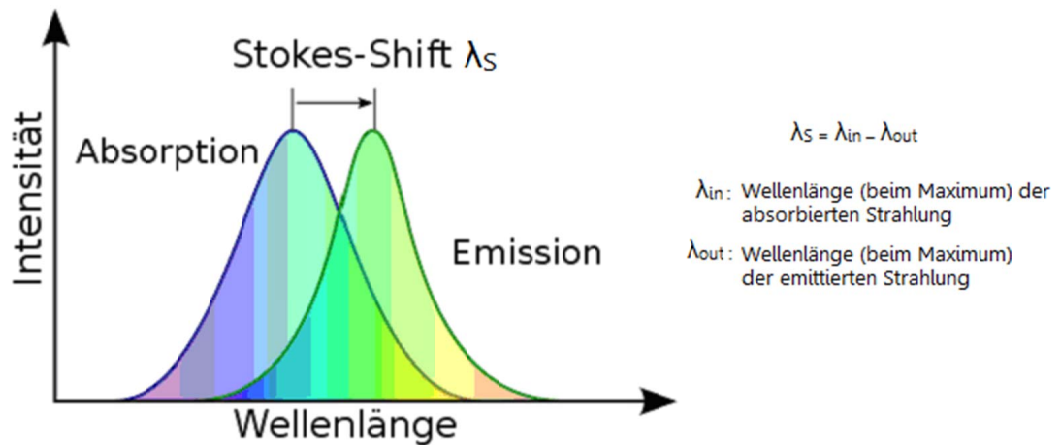


Abbildung 5.2 Absorptions- und Emissionspektrum mit Stokes-Shift.

5.2 Fluoreszenzmikroskopie im Forschungsbereich der *Life Sciences*

Die Anwendung von fluoreszenzbasierten Techniken in den *Life Sciences* hat in den letzten Jahrzehnten enorm an Bedeutung gewonnen. Gründe für diesen Erfolg sind die vielen Vorteile der Fluoreszenzmessungen gegenüber den bisherigen Detektions- und Quantifizierungsmethoden wie z.B. den radioaktiven Methoden. Die Fluoreszenzdetektion und -quantifizierung ist deutlich preiswerter, schneller, flexibler und sicherer als die entsprechende Radiodetektion. Weitere Vorteile sind die hohe Sensitivität, die hohe Stabilität der *Labels* und die Möglichkeit der Multicolor-Detektion, die die gleichzeitige Detektion von zwei oder mehr markierten *Targets* in einer einzigen Untersuchung ermöglicht.^[78, 82] Eine dieser fluoreszenzbasierten Techniken ist die Fluoreszenzmikroskopie. Sie nimmt in den *Life Sciences* eine besondere Rolle ein und ist dank hoher Spezifität und Sensitivität in der Lage, biochemische und biophysikalische Eigenschaften/Prozesse sowie die Morphologie von Geweben zu detektieren (Abbildung 5.3).^[82]

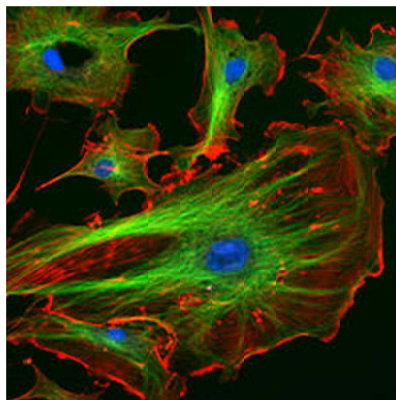


Abbildung 5.3 Endothelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Mikrotubuli sind grün, Aktinfilamente sind rot markiert. Die DNA in den Zellkernen wurde blau angefärbt.

Da die wenigsten Biomoleküle jedoch eine ausreichend hohe intrinsische Fluoreszenz besitzen, ist die Markierung (*Labeling*) der zu untersuchenden Substanz mit geeigneten Fluorophoren für die Detektion notwendig.^[79] Das *Label* kann dabei entweder kovalent an das Biomolekül oder bei ausreichend hoher Affinität nicht-kovalent an ein Protein assoziiert werden. Bei der kovalenten Bindung wird ein reaktives Derivat des Fluorophors, das z.B. eine aminreaktive Isothiocyanat- oder Succinimidylester-Funktion trägt, benötigt. Wichtig beim Fluoreszenzmarkieren ist, dass die biologische Aktivität des Zielmoleküls nicht beeinträchtigt werden darf.^[84] Mit Hilfe dieser *Labels* hat sich die Fluoreszenzmikroskopie zu dem wichtigsten Werkzeug, das zum Verständnis dynamischer Prozesse und subzellulärer Architektur von Zellen und Geweben beiträgt, entwickelt. Mittels Fluoreszenz-*Imaging* können einerseits molekulare Angriffsziele (*Targets*) und Wirkmechanismen von Naturstoffen studiert und zum anderen dynamische Prozesse und Variablen (Metallionenkonzentration, pH-Wert, Membranpotential,...) abgebildet werden.^[74, 82] Neben Erleichterung des genetischen *Mappings* und der Chromosomenanalyse durch Fluoreszenzassays und Technologien wie Genchips erleichtern Fluoreszenz-*Labels* in Zukunft die medizinische Diagnostik z.B. als Kontrastmittel und zur Tumordetektion.^[82]

Obwohl viele Fluoreszenzmarker bekannt und kommerziell erhältlich sind, wächst die Liste an Fluorophoren und deren Anwendung täglich. Es besteht weiterhin Bedarf an neuen Fluorophoren mit verbesserten und speziell für die Anwendung maßgeschneiderten Eigenschaften.^[85] Eine große Herausforderung bei der Entwicklung neuer Fluorophore ist eine gute Wasserlöslichkeit, hohe Quantenausbeuten und die Einführung funktioneller Gruppen an das Grundgerüst, um eine effiziente kovalente Bindung an das Biomolekül zu ermöglichen.^[86] Besonders interessant sind Fluorophore, die bei höheren Wellenlängen (>600 nm) fluoreszieren, da bei diesen Wellenlängen die Autofluoreszenz von Zellen und Geweben abnimmt und die Fluoreszenz des *Labels* gegenüber dem Untergrund besser detektiert werden kann.

5.3 Fluorophore in den Life Sciences

Als Fluorophor wird eine Substanz bezeichnet, die aufgrund ihrer Struktur in der Lage ist, absorbiertes Licht in Form von Fluoreszenz wieder freizugeben. Diese Substanzen lassen sich in intrinsische und extrinsische Fluorophore unterteilen.^[79] Zu den intrinsischen Fluorophoren, die natürliche Fluoreszenz zeigen, zählen die aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan), die Enzym-Cofaktoren NADH, Peridoxylphosphat, FAD, Porphyrine und Chlorophyll. Die intrinsische Fluoreszenz ist meist nicht ausreichend, so dass extrinsische Fluorophore zum Einsatz kommen. Extrinsische Fluorophore werden zu den Proben gemischt oder kovalent an das zu untersuchende Molekül gebunden, um Fluoreszenz zu erzeugen, wenn die intrinsische der Substanz zu schwach ist, oder um die spektroskopischen Eigenschaften der Probe zu verändern.^[79] Ein großer Vorteil der extrinsischen

Fluorophore ist, dass sie speziell für die Anwendung maßgeschneidert werden können. Hierbei sind grundlegende Eigenschaften die spezifische Bindung an das Zielmolekül (*Target*), eine hohe Photostabilität, hohe Quantenausbeuten, geringe Toxizität und Kosten sowie die Kompatibilität mit der Messvorrichtung (Anregungsquelle, Filter,...).^[82] Generell lassen sich Fluorophore in drei Klassen einordnen: genetisch kodierte Fluoreszenzproteine, Semikonduktoren-Nanokristalle (*quantum dots*) und organische Fluorophore.^[76]

5.3.1 Fluoreszenzproteine

Der Einsatz von genetisch kodierten Fluoreszenzproteinen hat in den letzten Jahren rasanten Einzug in die moderne biologische Forschung gehalten und konnte sich dort als Standardtechnik etablieren.^[87] Das bekannteste Fluoreszenzprotein ist das aus der Qualle *Aequorea victoria* isolierte grün fluoreszierende Protein (GFP). Erst dreißig Jahre nach der Isolierung durch Shimomura (1962) wurde das GFP durch rekombinante Expression in *Escherichia coli* genetisch entschlüsselt, erste Fusionsproteine hergestellt und so der eigentliche biotechnologische Wert des Proteins als einen auf einem einzigen Gen kodierten, autokatalytisch fluoreszierenden Proteinmarker erkannt. Die weit verbreitete Anwendung und Bedeutung wurde 2008 mit dem Nobelpreis in Chemie anerkannt.^[84] Zur Herstellung von Fusionsproteinen wird die DNA des Fluoreszenzproteins über Transfektion in das Gen des *Host*-Proteins (Ziel-Protein) so eingebracht, dass die Zelle das Fusionsprotein selbstständig exprimiert. Dabei müssen drei Punkte beachtet werden: das Fluoreszenzprotein muss korrekt gefaltet sein, damit es fluoresziert; das *Host*-Protein muss ebenfalls korrekt gefaltet sein, damit es seine biologische Funktion behält. Außerdem muss die Intaktheit des Fusionsproteins aufrecht erhalten werden.^[76] Viele Fluoreszenzproteine besitzen optimale spektrale Eigenschaften, wie insbesondere rote Fluoreszenz zur Abhebung von der biologischen Autofluoreszenz, weisen aber nur ungenügende Photostabilität und Sensitivität auf.^[87] Dies ist nur ein Grund für die Limitierung von Fusionsproteinen in den *Life Sciences*. Ein stark limitierender Faktor ist ihre relativ große Größe (GFP: ca. 230 Aminosäuren, Masse von ca. 27 kDa), die zu Struktur- und Funktionsstörungen des Ziel-Proteins und so zu Fehlexpression und -lokalisation des Proteins führen kann.^[88] Weitere Nachteile sind die Aggregation und Oligomerisierung bei der Erzeugung von Fusionsproteinen, die zeitaufwändige Expression und das unflexible *Labeling*. Das Fluoreszenzprotein kann ausschließlich *via* Peptidbindung an den C- bzw. N-Terminus des Host-Proteins gebunden werden, wohingegen kleine organische *Labels* über chemische Markierungstechniken an spezifische Positionen des Moleküls angebracht werden können.^[76]

5.3.2 Quantum dots

Seit ihrer Entwicklung in den 1980iger Jahren wurden *Quantum dots*, auch Halbleiter-Nanokristalle genannt, zunehmend in biologischen Fluoreszenzmessungen eingesetzt. *Quantum dots* sind 2–50 nm große Nanokristalle, die aus nanometer-großen Kristallclustern von ein paar hundert bis tausend Atomen aufgebaut sind (Abbildung 5.4).^[89, 90] Gebräuchliche Materialien sind u.a. CdSe, CdS, CdTe. Aufgrund ihrer geringen Größe weisen sie ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis auf, wodurch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften von ihrer Oberfläche dominiert werden. Bei Anregung emittieren *Quantum dots* Fluoreszenz einer von ihrer Größe abhängigen Wellenlänge. Kleine *Quantum dots* emittieren dabei Wellenlängen höherer Energie als größere und so ändert sich die Emission von blau zu rot mit zunehmender Größe des Nanokristalls.

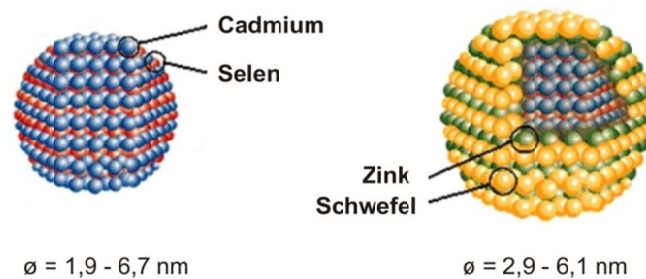


Abbildung 5.4 Schematischer Aufbau eines CdSe Quantum dots mit CdSe-Halbleiterkern (links), der von einer ZnS-Hülle (rechts) umgeben ist.

Ein großer Vorteil von *Quantum dots* ist, dass ihre optischen Eigenschaften durch Änderung ihrer Zusammensetzung und Größe maßgeschneidert werden können.^[89, 90] Desweiteren zeigen diese photostabilen Halbleiterkristalle scharfe und symmetrische Emissionspeaks, was die simultane Anregung verschiedener *Quantum dots* mit einer Anregungsquelle erlaubt. Dennoch besitzen *Quantum dots* einen entscheidenden Nachteil: ihre fehlende Biokompatibilität. Die schwermetallhaltigen Kristalle sind toxisch und greifen in die zu untersuchenden biologischen Prozesse ein.

5.3.3 Organische Fluorophore

Organische Fluorophore sind die ersten fluoreszierenden Verbindungen, die in der biologischen Forschung eingesetzt wurden. Heute stellen sie die am meisten genutzten Fluoreszenz-Labels dar.^[76, 89] Ihr flexibles Design, die geringe Größe – die eine Bindung des Fluorophors an das Makromolekül ohne Funktionsverlust erlaubt – sowie die spezifische Markierung bestimmter Molekülpositionen bevorzugen die organischen Fluorophore gegenüber Fluoreszenzproteinen. Weitere Vorteile sind ihr niedriger Preis, die gute Verfügbarkeit und das Vorhandensein bereits etablierter Methoden zur Konjugation der Farbstoffe an Biomoleküle.^[76, 91] Organische Fluorophore sind z.B. klassische Chromophore für Fluoreszenz-

Resonanz-Energie-Transfer-Messungen (FRET). FRET-Messungen können als spektroskopisches Lineal aufgefasst werden, mit dem der Abstand zwischen zwei fluoreszenzmarkierten, funktionellen Gruppen (Donor und Akzeptor) bestimmt werden kann. Die organischen Fluoreszenz-Farbstoffe besitzen unter anderen Polymethin-, Xanthen- oder Cumarin-Grundstrukturen (Abbildung 5.5).^[76, 91]

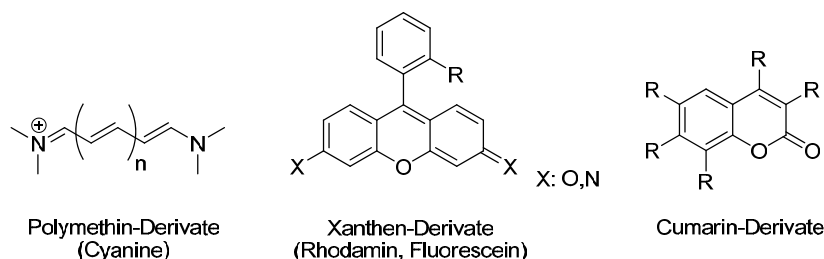


Abbildung 5.5 Beispiel-Grundstrukturen organischer Fluorophore.

5.3.3.1 Cumarin-Farbstoffe

Die Stoffklasse der Cumarine wurde erstmals durch Isolation aus der *Coumarouna odorata Aube* (Tonkabohne) entdeckt. Diese Pflanze war auch namensgebend für die häufig vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. 1985 untersuchte Bose^[78] die wichtigsten biologischen Eigenschaften von natürlichen Cumarinen, die chemisch gesehen Benzo- α -pyrone darstellen. Neben einer antibakteriellen, antiviralen, antioxidativen und anti-koagulanten Wirkung zeigten Cumarine Fluoreszenz. Cumarine gehören zu der Gruppe der blau fluoreszierenden Verbindungen, d.h. sie absorbieren ($\lambda_{\text{Abs}} = 354\text{--}423\text{ nm}$) und emittieren ($\lambda_{\text{Em}} = 420\text{--}590\text{ nm}$) im sichtbaren Bereich.^[78] Das einfachste, unsubstituierte Cumarin (Abbildung 5.6, alle R= H) emittiert allerdings kein Fluoreszenzlicht. Erforderlich für die Fluoreszenz der Cumarine ist die Generierung eines „push-pull“-Systems, das durch Substitution des Grundgerüsts erzeugt werden kann. Hierzu muss an Position sechs (R^6) oder sieben (R^7) ein Elektronendonator sitzen, der durch einen +M-Effekt Elektronen in das System schiebt, während an Position drei (R^3) oder vier (R^4) ein Elektronenakzeptor (-M- oder -I-Effekt) diese Elektronen dem System wieder entzieht. Die Fluoreszenzeigenschaften dieser Stoffe sind stark von dem Substitutionsmuster abhängig, wodurch eine große Zahl von blauen Fluorophoren mit spezifischen Fluoreszenzeigenschaften zur Verfügung steht. Eine Vergrößerung des Fluorophors führt zu einer bathochromen Verschiebung (Verschiebung zu längeren Wellenlängen) des Absorptions- und des Emissionsmaximums. Cumarine sind aufgrund ihrer blauen Fluoreszenz besonders für vielfarbige Untersuchungen wie z.B. Immunfluoreszenzmessungen, Nukleinsäure- und Proteinassays geeignet, da sich ihre Fluoreszenz leicht von grünem, gelbem und rotem Licht unterscheiden lässt. Weiterhin sind sie ideale Fluorophore zur Derivatisierung von Aminosäuren und Peptiden.^[78, 79]

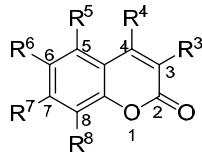


Abbildung 5.6 Grundstruktur der Cumarine.

Cumarine zeigen hervorragende spektroskopische Eigenschaften. Neben der guten Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln besitzen diese Fluorophore eine breite spektrale Reichweite, eine gute Photostabilität, eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute sowie eine hohe Absorption. Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Detektion von markierten Peptiden im pikomolaren Massstab mit gleicher Sensitivität wie beim *Radio-Labeling* ermöglicht.^[86] Ein weiterer Vorteil ist, dass es sich bei Cumarinen um ungeladene Fluorophore handelt, die membrangängig sind. Die Absorption der Cumarine im UV-Bereich kann allerdings auch nachteilig sein. Bei Einsatz in biologischen Messungen kann es zu Störungen durch Autofluoreszenz des Gewebes kommen bzw. das native Gewebe kann durch das energiereiche Licht beschädigt werden. Die am häufigsten verwendeten Cumarin-Farbstoffe sind das 7-Hydroxycumarin und seine Analoga.^[78] Jedoch zeigen diese Cumarine nur in ihrer deprotonierten Form Fluoreszenz. Sie entfalten ihre maximale Fluoreszenz erst bei einem pH-Wert von 10 oder höher. Da die meisten Enzyme ein Maximum ihrer katalytischen Aktivität bei einem pH-Wert von 7 oder niedriger aufweisen, stellt sich die Verwendung von 7-Hydroxycumarinen in Enzymuntersuchungen als schwierig heraus.^[92] Diese pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz kann durch den Einsatz von 7-Dialky-Aminocumarinen ($R^7 = NR_2$) umgangen werden. Die bedeutend weniger pH-sensitiven 7-Aminocumarine gehören zu den intensiv fluoreszierenden Molekülen der Cumarinfamilie und besitzen exzellente Fluoreszenzquantenausbeuten. Im Gegensatz zu den 7-Hydroxycumarinen sind 7-Aminocumarine nicht leicht herzustellen, weshalb nur wenige Beispiele der Modifikation von 7-Aminocumarinen zur Verbesserung ihrer spektroskopischen Eigenschaften bekannt sind.^[93]

5.3.3.2 Fluorescein-Farbstoffe

Fluoresceine sind polycyclische Fluorophore (Abbildung 5.7) mit einem Absorptions- und Emissionsmaximum im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums ($\lambda_{Abs} = 480\text{--}600\text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 510\text{--}615\text{ nm}$).^[86] Nach der Veröffentlichung der Totalsynthese des stark fluoreszierenden Moleküls im Jahre 1871^[78, 79] wurden viele verschiedene Analoga synthetisiert, die eine Vielzahl an reaktiven Gruppen tragen und ein vielfältiges Anwendungsprofil besitzen. Fluorescein-Farbstoffe gehören zu den gängigsten *Labels*, die in biologischen Anwendungen wie dem Fluoreszenzmarkieren von Antikörpern (Immunohistochemie), eingesetzt werden.^[78, 79]

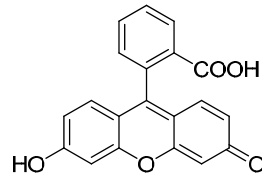


Abbildung 5.7 Struktur der Fluorescein-Fluorophore.

Zusätzlich zu der relativ hohen Absorption, den exzellenten Fluoreszenzquantenausbeuten bei einem pH-Wert > 8 und der guten Wasserlöslichkeit haben Fluoresceine den Vorteil, dass ihr Anregungsmaximum ($\lambda_{\text{Abs}} = \text{ca. } 494 \text{ nm}$) sehr dicht an der Spektrallinie des Argonlaser (488 nm) liegt, was sie zu einem wichtigen Fluorophor der konvokalen Laser-*Scanning* Mikroskopie und der Fluss-Cytometrie macht.^[86] Trotz der guten spektroskopischen Eigenschaften wurden Fluorescein und seine Analoga immer mehr von neu entwickelten Fluorophoren verdrängt. Grund für die Verdrängung sind die großen Nachteile dieser Fluorophore wie z.B. die sehr hohe *Photobleachingrate* (permanenten Verlust der Fluoreszenz eines Fluorophors durch die Bestrahlung des Fluorophors mit dem Anregungslicht), die geringe Photostabilität und die Tendenz zum *Selbstquenching* bei Konjugation an Biopolymere. Die zwei wichtigsten Faktoren, die die bioanalytische Anwendung stark einschränken, sind allerdings die pH-sensitive Fluoreszenz und die relativ breiten Emissionsspektren.^[86] Im wässrigen Milieu liegt das Fluorophor je nach pH-Wert als geladenes oder ungeladenes Teilchen vor. Ladungsabhängig verändern sich auch die spektroskopischen Eigenschaften des Fluorophors. Der pKs-Wert des Fluorescein beträgt 6.4, daher liegt Fluorescein bei physiologischem pH-Wert zu einem großen Teil in der nicht fluoreszierenden Spirolactonform vor.^[78] Durch die relativ breiten Emissionsspektren und die geringe Photostabilität sind quantitative Analysen und *Multicolor*-Untersuchungen mit diesem Fluorophor sehr schwierig.^[86]

5.3.3.3 Rhodamin-Farbstoffe

Die ältesten synthetischen Farbstoffe, die in Fabriken zum Färben genutzt wurden, sind Rhodaminfarbstoffe (Abbildung 5.8). Diese mit Fluorescein verwandten Xanthenfarbstoffe besitzen generell hohe Absorption im sichtbaren Bereich ($\lambda_{\text{Abs}} = 470\text{--}557 \text{ nm}$) und viele Derivate besitzen eine starke Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Em}} = 534\text{--}625 \text{ nm}$). Die Absorptions- und Emissionseigenschaften können durch die Substituenten am planaren Xanthengerüst, das an zwei Positionen eine alkylierte Aminogruppe trägt, beeinflusst werden (Abbildung 5.8).^[86]

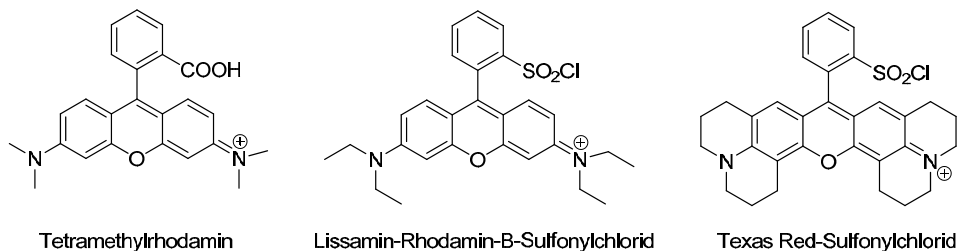


Abbildung 5.8 Struktur der Rhodamin-Farbstoffe.

Im Bezug auf ihre Größe zeigen diese Farbstoffe überraschend langwellige Absorptions- ($\lambda_{\text{Abs}} > 470 \text{ nm}$) und Emissionsmaxima ($\lambda_{\text{Em}} > 534 \text{ nm}$), wodurch sie auch als Fluoreszenzmarker in der Bioanalytik Anwendung finden.^[79] Durch die hohen Absorptionsbanden spielt die Autofluoreszenz der Proben keine Rolle mehr. Eine weitere Stärke dieser Farbstoffklasse ist das breite Strukturspektrum, das durch die Variation der Substituenten am Grundgerüst ermöglicht wird und die Rhodamine variabel in ihren spektroskopischen Eigenschaften macht. Eine Erweiterung des Xanthengerüsts, z.B. durch Einführung eines Julodinrings, führt zu einer deutlichen Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums zu längeren Wellenlängen (vgl. Abbildung 5.8, Texas Red, $\lambda_{\text{Em}} = 614 \text{ nm}$). Der Julodinring verhindert die Rotation um den Stickstoff, was zu einem deutlich bathochromen Effekt führt.^[78] Generell sind Rhodaminderivate bezüglich der Photostabilität, der pH-Stabilität und der *Quenchingeffekte* den Fluoresceinderivaten überlegen. Allerdings zeigen Rhodamine ein stark lösungsmittelabhängiges *Photobleaching*. Zudem neigen sie zur Aggregatbildung, was u.a. eine Erklärung für die beobachtete konzentrationsabhängige Fluoreszenzlöschung sein könnte. Die Klasse der Rhodaminfarbstoffe verlor an Bedeutung, da überlegene Fluorophore wie BODIPY- und Alexa-Farbstoffe entwickelt wurden, die ebenfalls Absorptionsmaxima um 520 nm besitzen.^[78]

5.3.3.4 Alexa-Fluorophore

Haugland *et al.* beschrieben 1999 die Darstellung von Rhodamin- und Cumarinderivaten, die eine höhere Photostabilität und eine geringe pH-Abhängigkeit (pH-Stabilität von pH 4.0–9.0) besitzen. Diese sulfonierten Rhodamine und Cumarine wurden als Alexa-Farbstoffe bezeichnet (Abbildung 5.9). Durch Sulfonierung der Farbstoffe verringert sich die Tendenz der Moleküle, sich zu Aggregaten zusammenzulagern, was vermutlich mit der erhöhten Polarität der Moleküle zu erklären ist. Neben der Verringerung des Fluoreszenzverlustes durch *Autobleaching* konnte durch Sulfonierung mit Chlorsulfonsäure die Emissionsintensität in wässrigem Milieu erhöht werden. Dadurch ist eine größere Sensitivität gegeben.^[78] Ein weiterer Effekt der Sulfonierung ist, dass das neutrale Cumarin bzw. das zwitterionische Rhodamin eine negative Ladung trägt, wodurch eine höhere Hydrophilie des Fluorophors erreicht wird. Für jede Absorptionswellenlänge gibt es aufgrund der großen Auswahl an

Ausgangsverbindungen einen passenden Alexa-Farbstoff. Blaue Alexa-Fluorophore werden aus modifizierten Cumarinen und grüne bzw. rote Fluorophore aus den entsprechenden Rhodaminderivaten gewonnen.

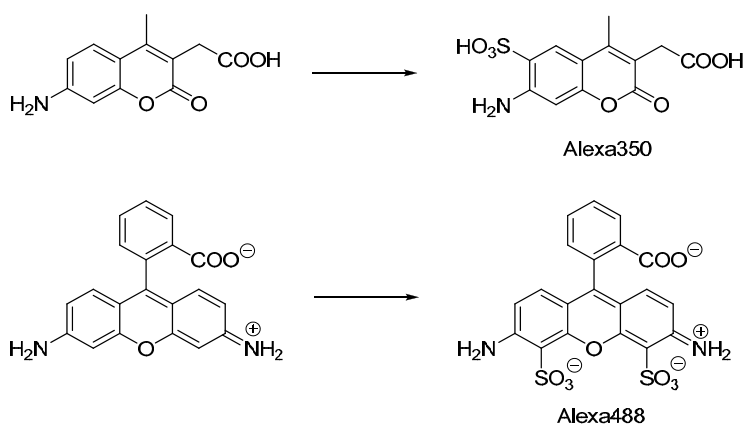


Abbildung 5.9 Synthese von Alexa-Farbstoffen durch Sulfonierung von Cumarinen und Rhodaminen.

5.3.3.5 BODIPY-Fluorophore

Eine jüngere Generation der organischen Fluorophore sind BODIPY-Farbstoffe. Ihre Herstellung wurde im Jahre 1986 von Treibs und Kreuzer zum ersten Mal beschrieben. Der Name leitet sich von dem Grundgerüst aller BODIPY-Derivate ab: **Bordipyrrol** oder auch **Borat-Dipyromethin**.^[78] Diese Fluorophore, die in Abhängigkeit von ihrer genauen Struktur Absorptionswellenlängen von 504 bis 544 nm und Emissionswellenlängen von 510 bis 675 nm besitzen, stellen mit ihrer intensiv gelbgrünen Fluoreszenz in allen Lösungsmitteln einen guten Ersatz für Fluorescein und Rhodamin dar.^[79]

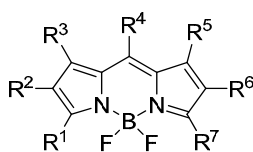


Abbildung 5.10 Grundkörper des BODIPY-Fluorophors.

Aufgrund ihrer vorteilhaften spektroskopischen Eigenschaften ist das Interesse an BODIPY-basierten Fluorophoren in den letzten Jahren stark angewachsen.^[86] Zu diesen Eigenschaften zählen eine exzellente Photostabilität, hohe Fluoreszenzquantenausbeuten ($\phi > 0.8$) und Extinktionskoeffizienten, sowie gute Löslichkeit, chemische Robustheit und die Unabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Lösungsmittelpolarität und dem pH-Wert. Weiterhin zeigen BODIPY-Farbstoffe schmale, scharfe Emissionspeaks, was zu höheren Peakintensitäten als z.B. bei Fluorescein führt. Mit ihrer hohen Peakintensität zählen die BODIPY-Farbstoffe zu den am besten detektierbaren Aminderivatisierungsreagenzien für HPLC und Kapillarelektrophorese. Die borobasierten Chromophore sind auch ideal für *Multicolorlabel*-Untersuchungen geeignet, weil sich ihre Emissionsbanden kaum mit Absorptionsbanden von

verschiedenen roten Fluorophoren wie Texas Red überlagern. Durch die geringe Polarität des ladungsfreien Chromophors werden die farbstoffinduzierten Störungen der konjugierten funktionellen Gruppen minimiert.^[78] Jedoch stellen die schwache Polarität und die daraus resultierende Lipophilie auch Nachteile dar. Die Lipophilie der BODIPYs verhindert den Einsatz in einigen Testsystemen.^[78, 86] Seit der ersten Herstellung des BODIPY-Fluorophores wurden zahlreiche Derivate synthetisiert. Wichtige Eigenschaften der Fluorophore bei der Herstellung von Derivaten sind eine hohe Absorption, hohe Quantenausbeuten sowie die Substitution des Grundkörpers mit funktionellen Gruppen.

5.3.3.6 Cyanin-Farbstoffe

Die erste Totalsynthese von Cyaninen wurde im Jahre 1930 von Hammer *et al.* beschrieben. Diese Chromophore, die zu der Klasse der Polymethinfarbstoffe gehören, stellen die Hauptquelle für organische, langwellige Fluorophore dar.^[78] Cyanine besitzen Anregungsbanden im Bereich zwischen 600 und 900 nm und zeigen je nach Struktur eine Emission im nahen Infrarotbereich ($\lambda_{Em} > 550$ nm).^[79] Der Name der Farbstoffklasse basiert auf dem charakteristischen Grundgerüst dieser Substanzen, das sich aus einer Aneinanderreihung von Methingruppen zusammensetzt (Abbildung 5.11). Diese Methinkette mit konjugierten C-C-Doppelbindungen verknüpft zwei aromatische oder heterocyclische Ringe miteinander.^[78] Durch Verlängerung der Polymethinkette kann sowohl das Absorptions- als auch das Emissionsmaximum des Fluorophors bathochrom verschoben werden.^[79] Cyaninfarbstoffe haben seit ihrer Entdeckung zahlreiche technische Anwendungen gefunden. Dazu zählen nichtlineare optische Materialien, Fluoreszenzmarker für das biomolekulare *Labeling, in vivo-Imaging*, DNA-Sequenzierung und Proteomanalysen.^[86]

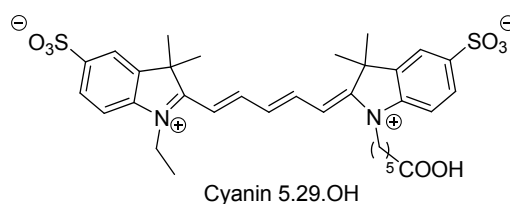


Abbildung 5.11 Beispielstruktur eines Cyanins.

Ein großer Vorteil der Cyanine sind ihre große Emissionswellenlängen und die Möglichkeit diese durch Verkürzung bzw. Verlängerung der Polymethinkette zu verschieben.^[86] Durch ihre Emission im höheren Wellenlängenbereich wird die störende Autofluoreszenz des Gewebes in biologischen Untersuchungen umgangen. Zudem können mehrere unterschiedlich fluoreszierende Fluorophore eingesetzt und getrennt detektiert werden, was die Verfolgung von mehreren Effekten gleichzeitig ermöglicht. Weiterhin besitzen diese Polymethinfarbstoffe scharfe und intensive Absorptionsbanden, eine pH-Stabilität von

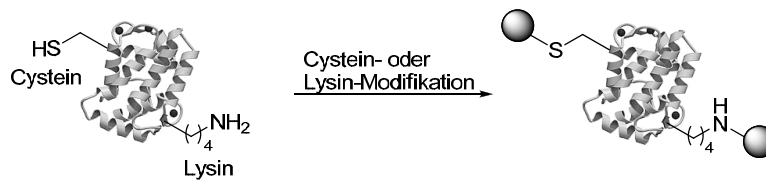
pH= 4.0–9.0 und niedrige bis mittlere Fluoreszenzquantenausbeuten ($\phi = 0.09\text{--}0.52$). Die niedrigen Quantenausbeuten lassen sich über eine thermo- und photoinduzierte *cis-trans*-Isomerisierung, die durch Verwenden von viskoserem Lösungsmittel unterdrückt werden kann, erklären.^[78] Neben den niedrigen Quantenausbeuten sind weitere Nachteile im analytischen Gebrauch von Cyaninen bekannt. Die meisten Cyanine haben kurze Fluoreszenzlebenszeiten und bilden in wässriger Lösung Aggregate, was zu niedrigen Fluoreszenzintensitäten führt. Auch die permanente Ladung der Cyanine und die daraus resultierende fehlende Membrangängigkeit ist für ihren Gebrauch in biologischen Systemen von Nachteil. Trotz dieser Nachteile werden Cyanine häufig als langwellige Fluorophore in Untersuchungen auf dem Gebiet der *Life Sciences* eingesetzt.^[78]

5.4 Chemische, kovalente Proteinmarkierungstechniken

Die wenigsten Biomoleküle besitzen eine ausreichend hohe intrinsische Fluoreszenz, so dass die Markierung (*Labeling*) der zu untersuchenden Substanz mit geeigneten Fluorophoren für deren Detektion essentiell ist. Zu dieser Klasse der Biomoleküle zählen auch die Proteine, weshalb in den letzten zehn Jahren zahlreiche Methoden für das Protein-*Labeling* entwickelt wurden.^[76] Beim Markieren von Proteinen mit extrinsischen Fluorophoren muss darauf geachtet werden, dass die biologische Aktivität des Proteins nicht beeinträchtigt wird, um zelluläre Prozesse untersuchen bzw. *Targets* identifizieren zu können.^[85]

Klassische Proteinmarkierungsmethoden, die die Kupplung von kleinen organischen Fluorophoren ermöglichen, umfassen im Wesentlichen einfache Reaktionen, die selektiv auf die Funktionalitäten in den Seitenketten der kanonischen, proteinogenen Aminosäuren wirken.^[94-97] Davon sind Cystein und Lysin die am häufigsten modifizierten Reste. Die Thiolgruppe des Cysteins kann über Disulfidaustausch gemischte Disulfide bilden, sowie durch Alkylierung mit Alkylhalogeniden oder Michael-Addition an α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen Thioether bilden (Tabelle 5.1, Eintrag 1–3). Cystein ist eine relativ seltene Aminosäure und kann so auch zur *Single-Site*-Modifizierung herangezogen werden. Die stärker verbreiteten Lysinreste sind beliebte Angriffspunkte, um *Labels* anzubringen, da eine Vielzahl an selektiven Modifizierungsmethoden von primären Aminen zur Verfügung steht. Zu diesen Methoden gehören die Umsetzung von Lysin mit aktivierten Estern, Sulfonylchloriden, Isocyanaten oder Isothiocyanaten zu Amid, Sulfonamiden, Harnstoffen bzw. Thioharnstoffen (Tabelle 5.1, Eintrag 4–7). Allerdings modifizieren alle diese Methoden auch den *N*-Terminus von Proteinen.^[94-97]

Tabelle 5.1 Klassische Proteinmarkierungsmethoden von Cystein und Lysin.



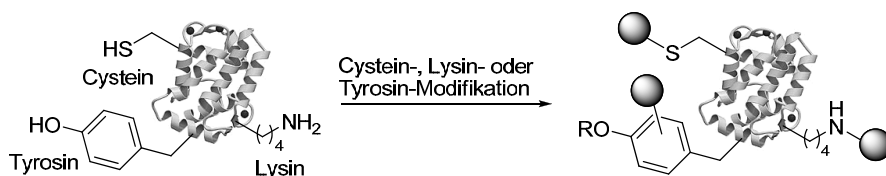
	Rest	Reagenz	Produkt
1	Cys		
2	Cys		
3	Cys		
4	Lys		
5	Lys		
6	Lys		
7	Lys		

Obwohl die klassischen Modifizierungsmethoden von Lysin- und Cysteinresten weiterhin Verwendung finden, wurden neue, selektive Methoden zur Umwandlung von Aminen und Thiolen entwickelt. Einige dieser neuen Techniken beruhen auf metallvermittelten Umwandlungen (Tabelle 5.2).^[98] Eine solche Methode wurde von Francis und McFarland entwickelt. Sie beschrieben eine Lysin-spezifische reduktive Alkylierung zur Modifizierung von Proteinen, die über eine Iridium-katalysierte Transferhydrierung verläuft (Tabelle 5.2, Eintrag 1).^[99] Während herkömmliche reduktive Alkylierungen mit Natriumborhydrid einen niedrigen pH-Wert erfordern, liefert diese Iridium-katalysierte Variante das Produkt auch bei einem pH-Wert von 7.4 mit hoher Ausbeute. Eine zweistufige Methode zur Modifizierung von Cystein wurde von Davis *et al.* entwickelt.^[100] Im ersten Schritt wird Cystein durch Umsetzung mit *O*-Mesitylsulfonylhydroxylamin unter basischen Bedingungen in Dehydroalanin umgewandelt (Tabelle 5.2, Eintrag 2). Das gebildete Dehydroalanin reagiert anschließend mit Thiolreagenzien in einer Michael-Addition unter Bildung einer Thioetherbindung. Eine weitere Cysteinmodifizierungstechnik, die zur Ausbildung eines Thioethers führt, beruht auf der Thiol-En-Click-Chemie (Tabelle 5.2, Eintrag 3).^[101, 102] Durch einen

Initiator oder durch Bestrahlung mit Licht wird ein Thiol-Radikal erzeugt, welches an ein Alken addiert. Bisher wurde die Thiol-En-Reaktion an Proteinen durchgeführt, die mit Thiolen^[103] oder Alkenen^[104] funktionalisiert sind.

Neuere Arbeiten konzentrieren sich auf die Modifizierung von Tyrosinresten und nutzen häufig Übergangsmetall-katalysierte Prozesse, die mit wässrigen Bedingungen vereinbar sind.^[84] Tyrosinreste kommen auf Proteinoberflächen selten vor und können so für eine kontrollierte *Single-Site*-Modifizierung herangezogen werden. Das erste Beispiel einer metallkatalysierten Modifizierung von Tyrosin war die oxidative Kupplung zweier Phenolgruppen von Kodadek *et al.* (Tabelle 5.2, Eintrag 4).^[105] Mit Hilfe dieser Methode können zwei Proteine unter Verwendung eines Nickel(II)-Katalysators und eines Cooxidans miteinander vernetzt werden. Weitere Techniken wurden von Francis *et al.* erforscht. Die Arbeitsgruppe modifizierte Tyrosinreste durch eine Dreikomponenten-Mannich-Reaktion^[106] mit Aldehyden und Anilinen (Tabelle 5.2, Eintrag 5) sowie durch Palladium- π -Allyl-Chemie (Tabelle 5.2, Eintrag 6).^[107]


Tabelle 5.2 Moderne Proteinmodifizierungstechniken von Lysin-, Cystein- und Tyrosinresten.



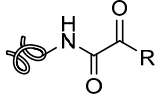
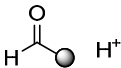
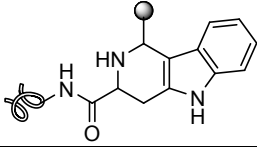
Rest	Reagenzien/Katalysator	pH	Produkt
1 Lys	 [Cp*Ir(bipy)(H ₂ O)]SO ₄ NaHCO ₂	7.4	
2 Cys	1) 2) HS-R	10-11	 (Cysteinstereochemie wird nicht beibehalten)
3 Cys	 hv oder AIBN	7.4	
4 Tyr	 Ni(OAc) ₂ Gly-Gly-His MMPP	7	
5 Tyr	 	6.5	
6 Tyr	 Pd(OAc) ₂	8.5-9	

Die Reaktivität des *N*-Terminus eines Proteins ist pH-abhängig, wodurch eine *Single-Site*-Modifizierung ermöglicht werden kann.^[108] Dank seines relativ zur Aminogruppe der Lysinseitenketten geringeren pK_s -Wertes kann der *N*-Terminus selektiv in Gegenwart vieler konkurrierender Lysinseitenketten acyliert oder alkyliert werden. Für die selektive *N*-terminale Modifizierung haben sich Transaminierungen besonders bewährt. Die erste bedeutende Transaminierung, die unter physiologischen Bedingungen ohne Zusatz von Metallen oder Basen abläuft, wurde von Francis *et al.* beschrieben (Tabelle 5.3, Eintrag 1).^[109] Zuerst kondensiert das *N*-terminale Amin mit Pyridoxal-5-phosphat und wird dann zum Pyruvamid hydrolysiert. Durch Reaktion der erhaltenen Pyruvamid-Ketogruppe mit Hydrazin- oder Aminoxyreagentien kann das Protein weiter modifiziert werden. Die besten Ergebnisse mit dieser Methode lieferten die Aminosäuren Alanin, Glycin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Asparagin in *N*-terminaler Position. Andere chemischen Methoden zur *N*-terminalen Modifizierung beruhen auf einem spezifischen Rest am *N*-Terminus. *N*-terminalen Tryptophanreste können in einer Pictet-Spengler-Reaktion selektiv mit Aldehydsonden reagieren (Tabelle 5.3, Eintrag 2).^[110] In dieser Reaktion wird, im Gegensatz zu Hydrazin/Aminoxy-basierten Methoden, in einem Schritt eine reversible Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zwischen Sonde und Protein gebildet.

Tabelle 5.3 Methoden zur Modifizierung des *N*-Terminus.



N-terminale Modifizierung

	N-terminaler Rest	Reagenzien	Produkt
1	Ala, Gly, Asp, Glu, Asn	Pyridoxal-5-phosphat	 <p>R= Seitenkette des N-terminalen Restes ● wird durch nachfolgenden chem. Markierungsschritt eingeführt</p>
2	Trp	 H ⁺	

Ein aufstrebender Bereich der *Life Sciences* hat sich zum Ziel gesetzt, Biomoleküle in lebenden Systemen mithilfe bioorthogonaler chemischer Reaktionen zu erforschen. Bioorthogonale Reaktionen greifen nicht in biologische Prozesse ein, sind inert gegenüber zahlreichen *in vivo* vorkommenden Funktionalitäten und laufen unter physiologischen Bedingungen mit hoher Geschwindigkeit ab.^[111] Der Prozess verläuft in zwei Schritten: Zuerst

werden Zellen oder Organismen mit einer metabolischen Vorstufe inkubiert, die eine einzigartige funktionelle Gruppe – den chemischen Reporter – enthält. Sobald der chemische Reporter in das Zielbiomolekül aufgenommen ist, wird er im zweiten Schritt mit einem Sondenmolekül, das eine komplementäre bioorthogonale Funktion trägt, umgesetzt. Zu diesen bioorthogonalen Reaktionen zählen beispielsweise die Kondensation von Aldehyden und Ketonen mit Aminoxy- und Hydrazidsonden, die Staudinger-Ligation von Triarylphosphanen und Aziden sowie die Click-Reaktion von Aziden mit Alkinen.

Aldehyd- und Ketonfunktionalitäten sind attraktive bioorthogonale Reporter. Diese kleinen funktionellen Gruppen können leicht in Biomoleküle eingeführt werden und sind bei neutralem pH-Wert inert gegenüber endogenen funktionellen Gruppen. Unter leicht sauren Bedingungen (pH= 5–6) reagieren Ketone und Aldehyde mit primären Aminen reversibel zu Schiff'schen Basen. Das Gleichgewicht liegt jedoch auf der Seite der freien Carbonylform.^[112]

Das Gleichgewicht kann durch Einsatz von Aminen, deren Nucleophilie durch den α -Effekt (erhöhte Nucleophilie eines Moleküls durch die Präsenz eines nahestehenden freien Elektronenpaares)^[113] verstärkt ist, auf die Seite des Imins verschoben werden (Abbildung 5.12).^[114] Typische Nucleophile sind Aminoxy- und Hydrazidverbindungen, die unter physiologischen Bedingungen mit Ketonen und Aldehyden Oxim- bzw. Hydrazonbindungen bilden. Allerdings werden Aldehyde und Ketone eher selten zur Markierung von Biomolekülen in Zellen eingesetzt, unter anderem wegen der Konkurrenz mit endogenen Aldehyden und Ketonen (z.B. Glucose und Pyruvat).

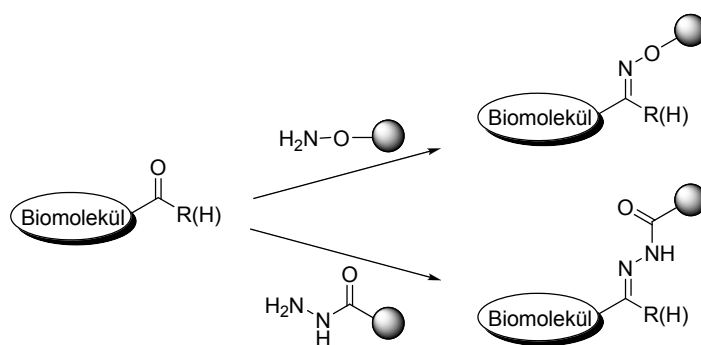


Abbildung 5.12 Bioorthogonale Kondensation von Ketonen/Aldehyden mit Amin-Nucleophilen.

Anders als Aldehyde und Ketone kommen Azide in biologischen Systemen nicht vor. Dies ist ein Grund, weshalb sich das Azid als eine besonders leistungsfähige Reportergruppe etabliert hat.^[115] Die Azidfunktion weist zugleich eine orthogonale Reaktivität zu der Mehrzahl der biologischen funktionellen Gruppen auf und ist klein, wodurch sie nur minimal störend in einem modifizierten Substrat wirkt.^[116, 117] Eine Anwendung des Azids in der bioorthogonalen Chemie ist eine Abwandlung der klassischen Staudinger-Reaktion von Aziden mit Triphenylphosphan (Abbildung 5.13).^[118] Durch Einführen einer Esterfunktion auf einen der Arylsubstituenten des Phosphans kann das intermediär gebildete Aza-Ylid eine intramolekulare Amidbindung eingehen. Ohne die Esterfunktion würde die Aza-Ylid-Zwischen-

stufe einfach zum entsprechenden Amin und Phosphanoxid hydrolysiert werden. Im letzten Schritt ergibt die Hydrolyse des Zwischenproduktes ein stabiles Ligationsprodukt, welches das Phosphanoxid in seiner Struktur enthält. Nachteile dieser Methode sind die Oxidation der Phosphine durch Luft oder metabolische Enzyme und die niedrige Reaktionsrate. Die Auswirkungen der Oxidation kann durch Verwenden eines großen Überschusses an Phosphin minimiert werden.^[112]

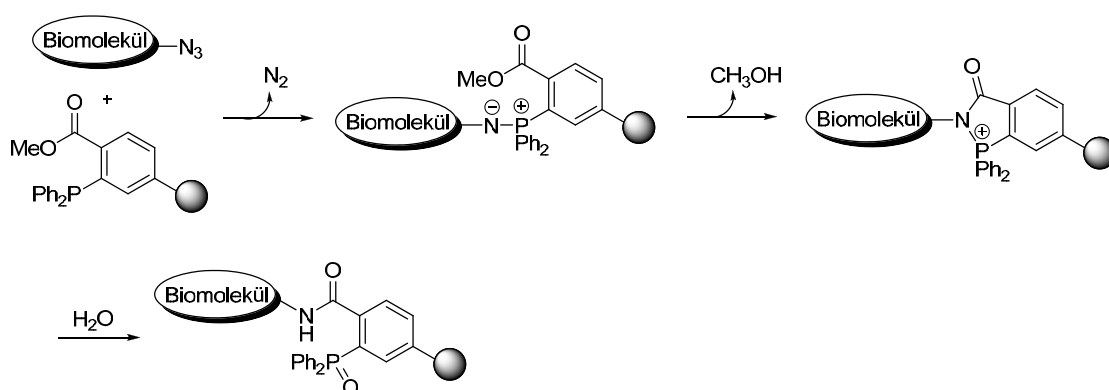
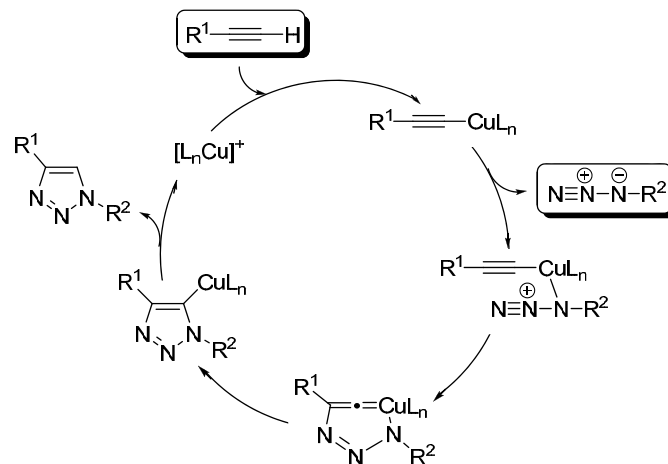


Abbildung 5.13 Staudinger-Ligation von Aziden mit Triarylphosphanen.

Eine weitere Anwendung des Azids in der bioorthogonalen Chemie ist die von Huisgen entwickelte 1,3-dipolare Cycloaddition an Acetylene zu Triazolen. Diese Cycloaddition gehört zu den Click-Reaktionen, die sich durch hohe Effizienz, Einfachheit und hohe Selektivität auszeichnen. Allerdings sind die für eine Cycloaddition erforderlichen hohen Temperaturen und Drücke mit lebenden Organismen nicht vereinbar.^[84, 112] Durch eine Weiterentwicklung von Sharpless *et al.* und Meldal *et al.* hat sich diese Technik trotzdem zu einem bevorzugten Werkzeug für die Markierung von Biomolekülen entwickelt. Diese heute als Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) bezeichnete Reaktion nutzt die Bildung eines Kupferacetylids zur Aktivierung terminaler Alkine für die biokompatible Reaktion mit Aziden (Schema 5.1, Abbildung 5.14).^[84] Der aktive Kupfer(I)-Katalysator kann hierbei ausgehend von Cu(I)- oder Cu(II)-Salzen generiert werden. Als Reduktionsmittel für die Cu(II)-Salze wird meist Natriumascorbat, das zusätzlich die Bildung von oxidativen Homokupplungs-Produkten verhindert, eingesetzt.

Sharpless postulierte, dass im ersten Schritt der Huisgen-Meldal-Sharpless-Click-Reaktion das Kupfer an das Alkin koordiniert, wodurch ein monomeres Kupfer(I)acetylid-Komplex gebildet wird (Schema 5.1). Basierend auf DFT-Rechnungen kann eine konzertierte [2+3]-Cycloaddition ausgeschlossen und eine schrittweise Anlagerung angenommen werden. Durch Bindung des Azids an das Kupfer des monomeren Kupfer(I)acetylid-Komplex wird ein weiterer Ligand ersetzt. Anschließend wird ein ungewöhnlicher, sechsgliedriger Kupfer(III)-Metallcyclus gebildet, dessen Aktivierungsbarriere für die Ringbildung gegenüber der un-katalysierten Reaktion deutlich abgesenkt ist. Abschließend wird durch eine Verengung des Metallcyclus zum Triazolyl-Kupfer-Derivat und Protonolyse das 1,2,3-Triazol gebildet.^[119]



Schema 5.1 Postulierter Reaktionscyclus der Huisgen-Meldal-Sharpless Click Reaktion.

Im Allgemeinen kann bei der Azid-Alkin-Click-Reaktion sowohl das 1,4- als auch das 1,5-substituierte Triazol gebildet werden (Abbildung 5.14). Während unter den klassischen Huisgen-Bedingungen (hohe Temperaturen) ein Gemisch der beiden Triazole gebildet wird, wird unter Kupferkatalyse ausschließlich das 1,4-Addukt gebildet.^[120] Im Gegensatz dazu ermöglicht eine Ruthenium-Katalyse die spezifische Herstellung des 1,5-disubstituierten Triazols.^[84, 121] Die Azid-Alkin-Click-Reaktion konnte lange Zeit nur *in vitro* in Zellen angewendet werden, da Kupfer in mikromolaren Konzentrationen toxisch ist. Die Forscher des Lawrence Berkeley National Labors entwickelten einen Weg die Kupfer-katalysierte Click-Chemie biokompatibel einzusetzen.^[122] Bei dieser Methode wird durch Zusatz eines Bis(*tert*-butyltriazoyl-methyl)amin-Liganden (BTES) die Toxizität des Kupfers herabgesetzt, ohne die katalytischen Eigenschaften zu beeinträchtigen. Auf diesem Weg konnten z.B. Glycane *via* Click-Chemie *in vivo* gelabelt werden. Im Vergleich zur kupferfreien Click-Chemie, die Stunden dauern kann, können Biomoleküle mit der Ligand-Kupfer-katalysierten Click-Reaktion in wenigen Minuten effektiv gelabelt werden.

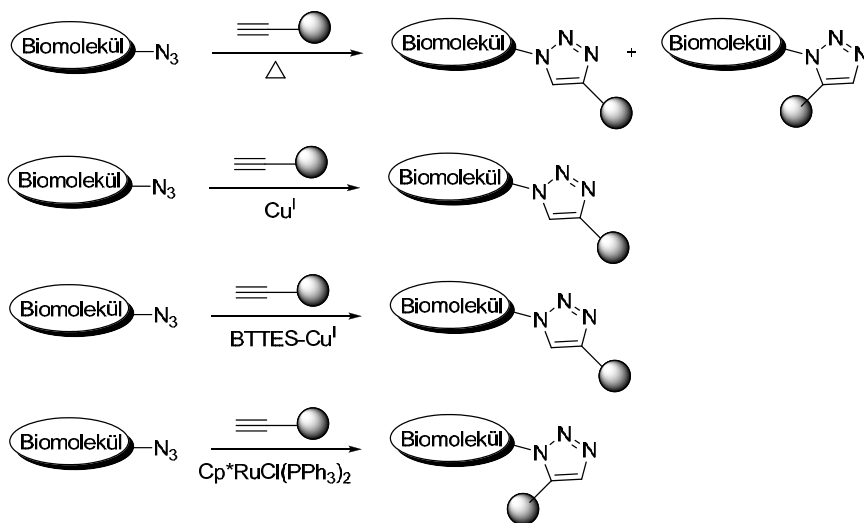


Abbildung 5.14 Click-Reaktionen von Aziden mit Alkinen.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Problemstellung

Das biomolekulare *Imaging*, also die *in vivo* Charakterisierung und Messung biologischer Prozesse auf dem zellulären bzw. molekularen Level, wird als die Zukunft des medizinischen *Imaging* betrachtet. Diese Technik ermöglicht die Beobachtung und Aufzeichnung des Verlaufs von molekularen oder zellulären Prozessen für die biochemische, biologische, diagnostische oder therapeutische Anwendung.^[75] Durch Fluoreszenzmarkierung von Biomolekülen können Wirkmechanismen aufgeklärt und Targets identifiziert werden und so Ansatzpunkte für die Medikamentenentwicklung gefunden werden. Die Arbeitsgruppe der Physiologie von Prof. Dr. J. Rettig (Universitätsklinikum Homburg) macht sich das biomolekulare *Imaging* zu Nutzen, um die Exozytose von Adrenalin in Nebennierenzellen zu untersuchen. Um die Untersuchungen weiter voran zu treiben, sollte ein autofluoreszierendes Adrenalinanalogon (Abbildung 6.1) in die Zellen eingeschleust und in den Vesikeln gelagert werden, um anschließend die Exozytose zu beobachten (siehe Kap. 6.2.3). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun ein *false fluorescent neurotransmitter* (FFN) synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert werden. Die Synthese dieses 7-Dialkyl-Aminocumarins war nicht literaturbekannt und sollte über eine Pechmann-Kondensation als Schlüsselschritt verlaufen. Weiterhin sollten, nach erfolgreichem Einstaz des FFN in das physiologische Testsystem, weitere Derivate synthetisiert werden. Die hergestellten Derivate sollten zum einen zur näheren Charakterisierung der beiden Zelltransporter (Zellmembran- und Vesikel-Transporter) dienen und andererseits die Verschiebung des Emissionsmaximums des FFN zu höheren Wellenlängen ermöglichen.

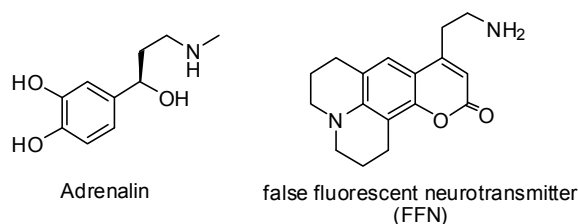


Abbildung 6.1 Strukturvergleich von Adrenalin mit dem *false fluorescent neurotransmitter*.

Eine Möglichkeit für das biomolekulare *Imaging* ist die Markierung von Biomolekülen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Um kleine organische Fluorophore an Biomoleküle zu binden, werden zunehmend bioorthogonale Reaktionen, die inert gegenüber zahlreichen *in vivo* vorkommenden Funktionalitäten sind, verwendet. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, bioorthogonale Methoden für die Fluoreszenzmarkierung von Aminosäuren und Peptiden zu entwickeln. Hierzu sollten neue 7-Dialkyl-Aminocumarin-Labels synthetisiert werden, die die Markierung an verschiedenen Positionen der Aminosäuren bzw. den Peptiden ermöglichen (Abbildung 6.2). Neben den bisher üblichen Positionen, dem *N*-/C-Terminus und der Seitenkette der Aminosäuren bzw. Peptide, sollte die Markierung auch am Rückgrat erfolgen.

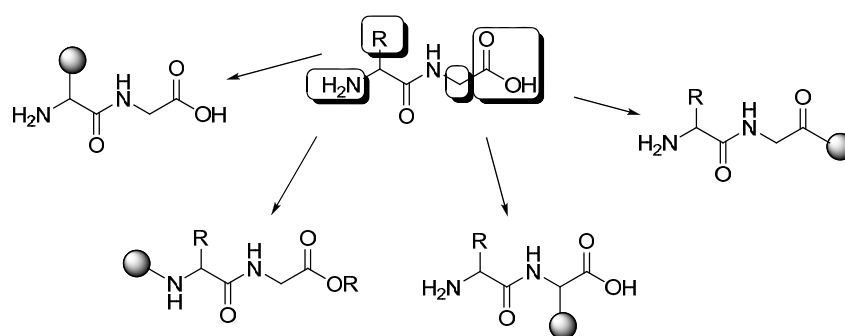
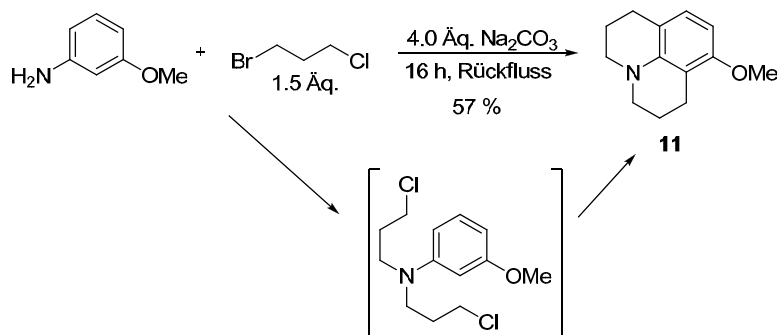


Abbildung 6.2 Mögliche Positionen für die Fluoreszenzmarkierung von Aminosäuren/Peptiden.

6.2 Synthese und Charakterisierung eines *false fluorescent neurotransmitters* (FFN)

6.2.1.1 Synthese des *false fluorescent neurotransmitter* (FFN)

Die Kernstruktur des *false fluorescent neurotransmitter* (FFN) besteht aus einem 7-Dialkyl-Aminocumarin. Zum Aufbau von Cumarinen wurden zahlreiche Reaktionen, die u.a. auf Perkin-^[123], Reformatsky-^[124] und Wittig-Reaktionen^[125] basieren, entwickelt. Die vermutlich am häufigsten benutzte Cumarinsynthese wurde allerdings von v. Pechmann^[126] entwickelt. Diese Methode wurde auch zur Synthese des *false fluorescent neurotransmitters* (FFN) angewendet. Durch Kondensation eines tricyclischen Aminophenols mit einem entsprechenden β -Ketoester sollte das 7-Aminocumarin aufgebaut werden. Im ersten Schritt wurde analog der Methode von J. van Gompel *et al.*^[127] das tricyclische Aminophenol hergestellt (Schema 6.1). Hierzu wurde 3-Methoxy-anilin mit 1.5 Äquivalenten 1-Brom-3-chlorpropan zur Reaktion gebracht. Das Anilin reagierte zuerst zum zweifach *N*-alkylierten Anilin, das anschließend in einer Friedel-Crafts- Reaktion zum 8-Methoxyjulodin **11** cyclisierte.



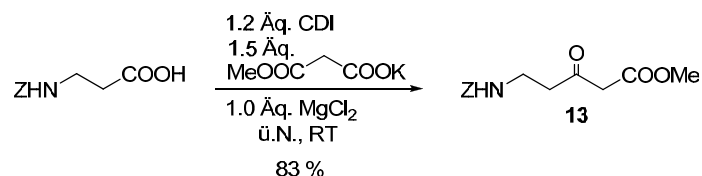
Schema 6.1 Aufbau der Vorstufe des tricyclischen Aminophenols.

Um das tricyclische Aminophenol zu erhalten, wurde der Methylether des 8-Methoxyjulodin **11** gespalten. Zur Etherspaltung wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Bei der ersten Methode von J. van Gompel et al.^[127] wurde der Ether unter Einfluss von Iodwasserstoff gespalten (Tabelle 6.1, Eintrag 1). Die Spaltung dauerte 50 Stunden und brachte das Aminophenol **12** mit einer Ausbeute von 51 % hervor. Anstelle von Iodwasserstoff verwendete die zweite Methode das Reagenz Bortribromid.^[128] Bei dieser Alternative konnte die Ausbeute zwar nicht gesteigert werden, jedoch konnte die Reaktionszeit drastisch auf eine Stunde verringert werden (Eintrag 2).

Tabelle 6.1 Etherspaltung von 8-Methoxyjulodin **11**.

	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
1	6.0 Äq. HI, 30 Äq. konz. HCl, 50 h, Rückfluss	51
2	1.0 Äq. BBr ₃ , DCM, 1 h, RT	53

Nach der Synthese des 8-Hydroxyjulodins **12** wurde ausgehend von *N*-Benzylcarbamatschutztem β -Alanin der analoge β -Ketoester **13** hergestellt (Schema 6.2). Wie von Hashiguchi^[129] beschrieben, wurde die Säurefunktion der Aminosäure zuerst mit Carbonyldiimidazol (CDI) über die Bildung eines gemischten Anhydrids aktiviert. Durch Angriff des freigesetzten Imidazols an das gemischte Anhydrid wurde das Imidazolid gebildet, das durch Angriff eines Magnesium-chelatisierten Monomethylmalonates und anschließender Abspaltung von CO₂ in den β -Ketoester **13** überführt wurde.

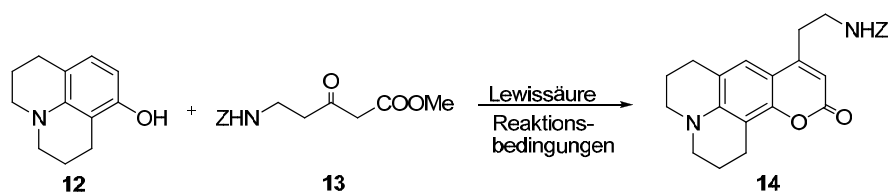


Schema 6.2 Synthese des β -Ketoesters aus Z- β -Alanin.

Zum Aufbau des Cumarinsystems wurde das Aminophenol **12** mit dem β -Ketoester **13** in einer Pechmann-Kondensation zur Reaktion gebracht.^[126] Im Allgemeinen werden Pechmann-Kondensationen mit starken Protonen- oder Lewisäuren und unter Erhitzen durchgeführt. Allerdings beschreibt S. Frère *et al.*^[130] die Verwendung von Aminophenolen in der Pechmann-Kondensation als schwierig. Während diese Cumarinsynthese für viele Phenole gut funktioniert, ist sie für Aminophenole aufgrund der möglichen Protonierung der Aminfunktion und der Deaktivierung des aromatischen Ringsystems durch Verwendung starker Säuren kritisch. Trotzdem wurde zuerst die Standardvariante der Pechmann-Kondensation unter Schwefelsäure-Katalyse angewendet (Tabelle 6.2, Eintrag 1).^[126] Wie befürchtet konnte unter diesen Bedingungen kein Produkt isoliert werden. Da sich starke Protonensäuren als ungeeignet für die Pechmann-Kondensation von Aminophenolen zeigten, wurden verschiedene Lewisäuren getestet. Aber auch ein Wechsel zu den in der Literatur beschriebenen Lewisäuren Zinkchlorid^[131] und Aluminiumchlorid^[132] brachte nicht den gewünschten Erfolg und das Cumarin konnte nur in Spuren im NMR nachgewiesen werden (Einträge 2 und 4). Auch durch Erhitzen in Toluol konnte mit den Lewisäuren Zinkchlorid und Aluminiumchlorid kein befriedigendes Ergebnis erzielt werden (Einträge 3 und 5). Als nächste Lewisäure wurde Wismutchlorid eingesetzt.^[133] Unter lösungsmittelfreien Bedingungen wurden die Kondensation des Phenols **12** mit dem β -Ketoester **13** in Anwesenheit von 5 mol-% Wismutchlorid bei 130 °C durchgeführt. Nach 16 Stunden Reaktionszeit wurde das Aminocumarin **14** nur mit einer Ausbeute von 10 % erhalten (Eintrag 6). Nachdem sich Wismutchlorid ebenfalls als ungeeignete Lewisäure erwiesen hatte, wurde versucht, das Cumarin **14** in einer Mikrowellen-Pechmann-Kondensation herzustellen.^[130] Durch Einsatz des festen Säurekatalysators Montmorillonit in Kombination mit Graphit sollte die Protonierung desamins umgangen und so das Produkt in guten Ausbeuten gebildet werden. Das eingesetzte Graphit dient in Mikrowellenreaktionen als Wärmevermittler. Diese Mikrowellen-Methode lieferte das gewünschte Produkt allerdings auch nur in einer sehr geringen Ausbeute von 9 % (Eintrag 7). Um das Problem der Aminprotonierung und die Komplexierung komplett auszuschließen, wurde das Phenol **12** zusammen mit dem β -Ketoester **13** ohne Säure über Nacht in Toluol erhitzt (Eintrag 8).^[134] Unter diesen Bedingungen wurde das bisher beste Ergebnis erzielt. Jedoch konnte auch in diesem Fall das Cumarin **14** nicht in präparativ nutzbaren Mengen isoliert werden. Die Lewisäure-Katalyse scheint für die Pechmann-Kondensation unerlässlich. Jedoch verliefen die Pechmann-Kondensationen aller bisher verwendeten Lewisäuren unvollständig – beide Edukte blieben zurück – und das gewünschte Produkt **14** konnte in nur unzureichenden Mengen isoliert werden. Auf der Suche

nach der idealen Lewisäure wurden Titan-Lewisäuren in der Pechmann-Kondensation eingesetzt. Die oxophile Titanspezies sollte bevorzugt am Sauerstoff des Phenols **12** koordinieren und nicht am Stickstoff. Zudem sind Titanalkoxide gute Katalysatoren für Umesterungsreaktionen.^[135] Sowohl die in der Pechmann-Kondensation ablaufende Umesterung zum β -Ketophenylester als auch die Friedel-Crafts-Kondensation sollte somit begünstigt sein. Zuerst wurde $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ als Titan-Lewisäure verwendet. In Gegenwart von $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ konnte die Ausbeute deutlich gesteigert werden. Die Kondensation brachte das Aminocumarin **14** in einer Ausbeute von 48 % hervor (Eintrag 9). Die Reaktion verlief aber immer noch unvollständig. Titan-Lewisäuren schienen jedoch gut für den Einsatz in Pechmann-Kondensationen geeignet. Um den Reaktionsverlauf zu vervollständigen und die Ausbeute weiter zu steigern, wurde $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ durch die stärkere Lewisäure $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$ ersetzt. Dabei wurde die Menge an $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$ variiert (Eintrag 10–12). Obwohl katalytische Mengen an Lewisäure ausreichend sein sollten, wurde das beste Ergebnis mit zwei Äquivalenten Lewisäure erhalten. Bei Verwendung von 0.5 und 1.0 Äquivalent $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$ verlief die Pechmann-Kondensation erneut unvollständig und niedrigere Ausbeuten wurden erzielt, wobei mit steigender Säuremenge eine Zunahme der Ausbeute zu beobachten war. Durch Kondensation des Phenols **12** und des β -Ketoester **13** in Gegenwart von zwei Äquivalenten $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$ verlief die Reaktion unter Erhitzen vollständig und lieferte das Aminocumarin **14** in präparativ nutzbaren Mengen (79 %).

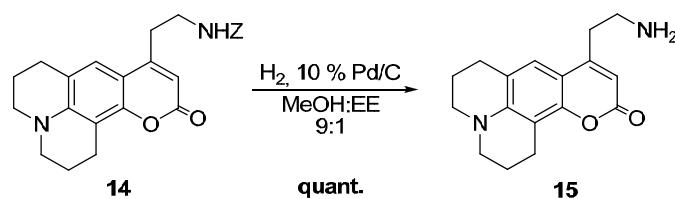
Tabelle 6.2 Pechmann-Kondensation des Aminophenols **12** mit β -Ketoester **13**.



	Säure	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
1	1.5 Äq. Konz. H_2SO_4	1 h, 75 °C	---
2	1.1 Äq. ZnCl_2	ü.N., 75 °C	Spuren
3	2.0 Äq ZnCl_2	ü.N., Rückfluss, Toluol	6
4	1.1 Äq. AlCl_3	ü.N., 75 °C	Spuren
5	2.0 Äq AlCl_3	ü.N., Rückfluss, Toluol	Spuren
6	5 mol-%. BiCl_3	ü.N., 130 °C	10
7	75 Gew.-% Montmorillonit	30 min, 90 W, 130 °C	9
8	---	ü.N., Rückfluss, Toluol	22
9	1.0 Äq. $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$	ü.N., Rückfluss, Toluol	48
10	0.5 Äq. $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$	ü.N., Rückfluss, Toluol	32
11	1.0 Äq. $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$	ü.N., Rückfluss, Toluol	65
12	2.0 Äq. $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$	ü.N., Rückfluss, Toluol	79

Die Aufarbeitung und Reinigung des Cumarins bereitete lange Zeit Probleme. Das Produkt fiel nicht wie in der Literatur^[126, 131-133] beschrieben im Reaktionsgemisch aus und konnte nicht durch Umkristallisation aufgereinigt werden. Auch die direkte säulenchromatographische Reinigung gestaltete sich schwierig. Grund für die Probleme schien die Titanpezies zu sein. Deshalb sollte das Titan durch Komplexbildung abgefangen werden. Letztendlich führte Verdünnen des Reaktionsgemisches mit Dichlormethan, Komplexieren des Titans mit Natrium-/Kalium-Tatrat und anschließende Extraktion des Produkts mit Dichlormethan zum Erfolg. Der erhaltene Extrakt wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand analog T. Besson *et al.*^[136] in minimaler Menge Ethanol aufgenommen und mit Hexan überschichtet. Nach Lagerung im Kühlschrank wurde ein gelber Feststoff erhalten, der durch Umkristallisation aus Ethanol aufgereinigt werden konnte.

Als letzter Schritt der Synthese wurde das als Benzylcarbamatgeschützte Amin der Seitenkette unter Einfluss eines Palladium-Katalysators in Wasserstoffatmosphäre entschützt (Schema 6.3). Die Doppelbindung des Cumarinsystems blieb dabei aufgrund der starken Mesomeriestabilisierung erhalten. Nach der Hydrierung konnte das fluoreszierende Adrenalin-Derivat **15** quantitativ isoliert und in physiologischen Untersuchungen eingesetzt werden.



Schema 6.3 Spaltung der Carbamat-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung.

6.2.2 Bestimmung der spektroskopischen Daten des *false fluorescent neurotransmitters* (FFN)

6.2.2.1 Bestimmung des Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektrums des FFN

Die folgenden Absorptions- und Emissionsspektren wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Jung der Biophysikalischen Chemie (UdS) gemessen. Alle Spektren wurden mit Hilfe eines FP-6500 Spektrofluorometers von Jasco aufgenommen. Für die Messungen wurden Quarzküvetten mit einem Durchmesser von 1 cm verwendet. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Software Origin 6.1 ausgewertet. Zuerst wurde das Absorptionsspektrum (Abbildung 6.3) bestimmt.

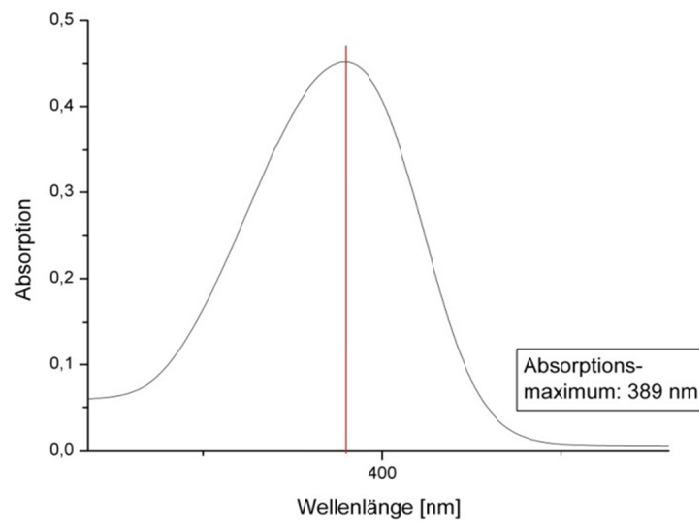


Abbildung 6.3 Absorptionsspektrum des FFN 15 in DMSO.

Nach Messung des Absorptionsspektrums und Bestimmung des Absorptionsmaximums wurden das Anregungs- und Emissionsspektrum des FFN aufgenommen. Anhand der ermittelten Maxima wurde der Stokes-Shift berechnet. Der Stokes-Shift ist die Wellenlängendifferenz zwischen dem Absorptions- λ_{Abs} und dem Emissionsmaximum λ_{Em} . Dieser Wert ist charakteristisch für die jeweilige Substanz.^[79] Im Falle des *false fluorescent neurotransmitters* FFN liegt der Stokes-Shift bei 65 nm.

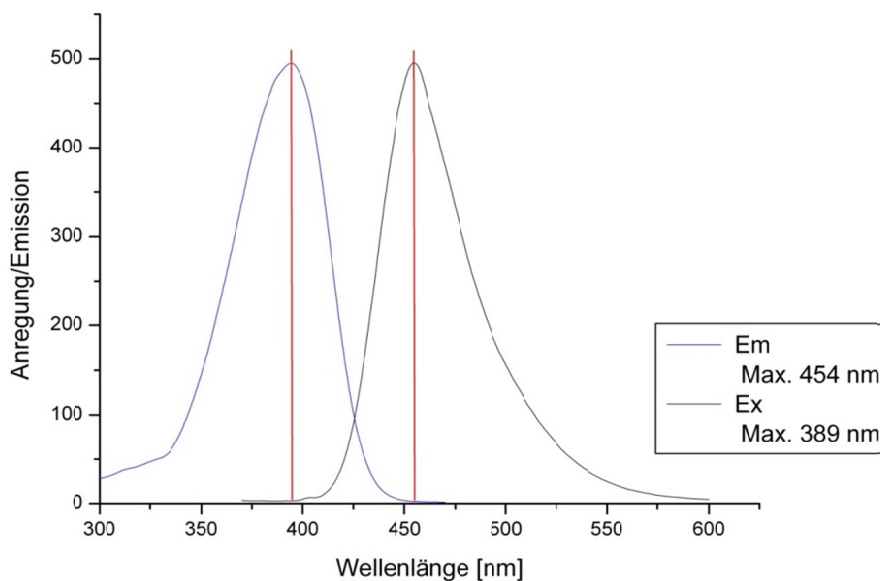


Abbildung 6.4 Anregungs- und Emissionsspektrum des FFN 15 in DMSO.

6.2.2.2 Untersuchung der Solvatochromie des FFN

Aus der Literatur^[137, 138] ist bekannt, dass die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffklasse der Cumarine eine große Lösungsmittelabhängigkeit zeigen. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt untersucht, ob der *false fluorescent neurotransmitter* (FFN) **15** einem solvatochromen Effekt unterliegt. Unter Solvatochromie wird im Allgemeinen die Beeinflussung eines Farbstoffes durch das Lösungsmittel (Solvens), das einen wesentlichen Einfluss auf die Lage, Intensität und Form der Banden der UV/Vis-Absorptionsspektren und somit auf die Farbe des Farbstoffes hat, verstanden.^[139] Ursache für die Lösungsmittelabhängigkeit der Wellenlänge von Lichtabsorption und -emission sind Wechselwirkungen zwischen gelöstem Stoff und Lösungsmittel. Diese Wechselwirkungen (z.B. Ion/Dipol, Dipol/Dipol, Elektronenpaar-Akzeptor, Elektronenpaar-Donor-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen) stabilisieren den Grund- und Anregungszustand unterschiedlich durch zwischenmolekulare Kräfte, wodurch die Anregungsenergie erhöht oder abgesenkt werden kann. Der Solvatochromie-Effekt wird im Wesentlichen durch die Relaxationszeit τ_R für die Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle und der Lebenszeit des Moleküls τ_A im angeregten Zustand beeinflusst.^[140] In Flüssigkeiten ist τ_R (Pikosekunden) viel kleiner als τ_A (Nanosekunden), wodurch sich die Lösungsmittelmoleküle umorientieren und einen angeregten Zustand niedriger Energie stabilisieren können (Abbildung 6.5).

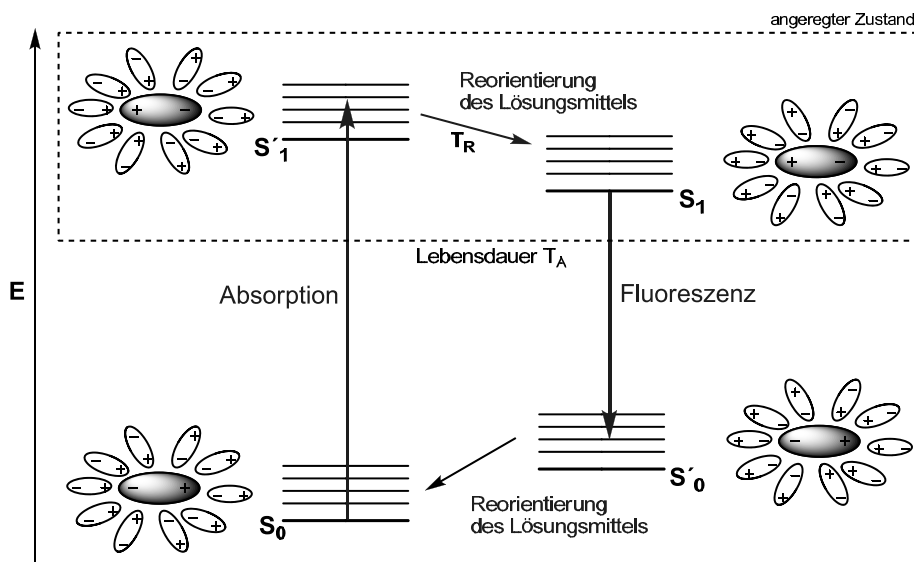


Abbildung 6.5 Schematische Darstellung des Solvatochromie-Effektes.

Im Grundzustand (S_0) ist der Farbstoff durch Wechselwirkung mit seiner Umgebung energetisch stabilisiert. Durch Absorption von Licht gelangt das Molekül vom untersten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes (S_0) in ein höheres Schwingungsniveau des Singulettzustands (S_1), dem angeregten Zustand mit der geringsten Energie. Die Umgebung des Moleküls bleibt dagegen zunächst unbeeinflusst. Während der Lebensdauer T_A des angeregten Zustands findet eine Umorientierung des Solvens statt. Durch diese Neu-

orientierung wird die Energie des elektronisch angeregten Zustandes (S'_1) etwas abgesenkt (S_1 , Relaxation). Erst im Anschluss an die Relaxation erfolgt die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand und damit verbunden die Emission. Die Reorientierung der Solvathülle findet wiederum etwas später statt. So ist dieser Grundzustand (S'_0 , Frank-Condon-Zustand) zum Zeitpunkt der Emission etwas energiereicher als der Zustand (S_0) zu Beginn des Prozesses.^[83] Durch diese Effekte der Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel und der daraus resultierenden unterschiedlichen Stabilisierung von Grund- und Anregungszustand kann das Absorptions- und Emissionsmaximums des Farbstoffes in Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität kurzwellig (hypsochrom) oder zu längeren Wellenlängen (bathochrome Verschiebung) verschoben werden.

Zur Untersuchung der Solvatochromie wurden Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektren des FFN **15** in fünf verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen (Abbildung 6.6). Anschließend wurden die Daten mit Hilfe der Software Origin 6.1 ausgewertet und die Maxima bestimmt. Die Maxima wurden in Tabelle 6.3 aufgelistet und daraus der Stokes-Shift berechnet.

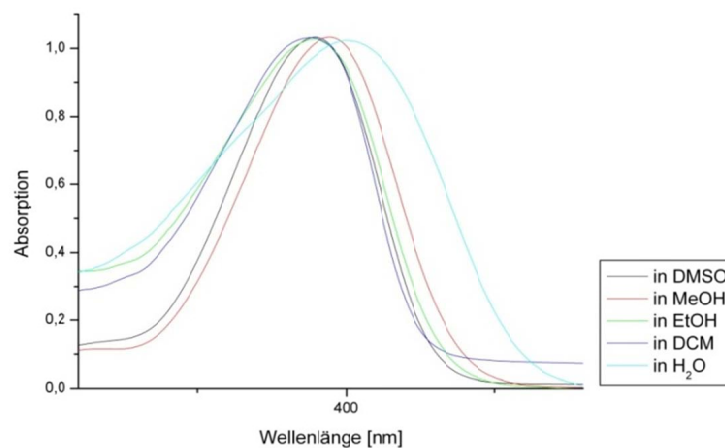


Abbildung 6.6 Absorptionsspektren des FFN **15** in verschiedenen Lösungsmitteln.

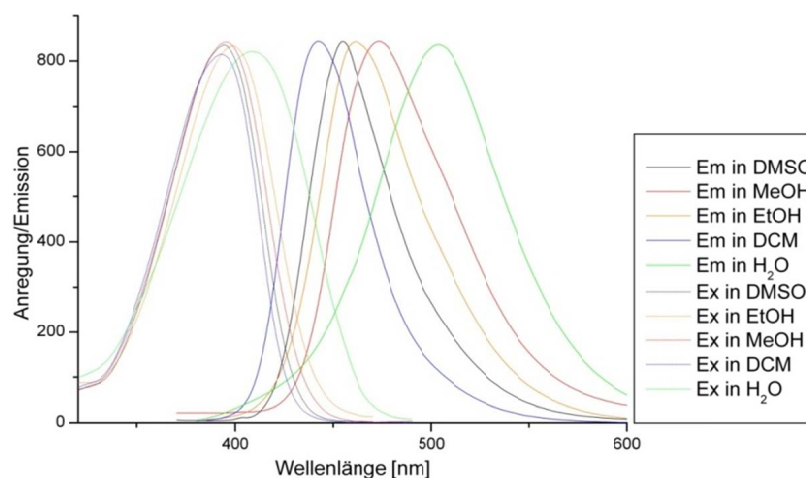


Abbildung 6.7 Anregungs- und Emissionsspektren des FFN **15** in verschiedenen Lösungsmitteln.

Tabelle 6.3 Solvatochromie von FFN **15**.

	Lösemittel	$\lambda_{\text{Abs}}=\lambda_{\text{Ex}}$ [nm]	λ_{Em} [nm]	Stokes-Shift ($\lambda_{\text{Em}}-\lambda_{\text{Abs}}$) [nm]
1	DCM	387	442	55
2	DMSO	389	454	65
3	EtOH	389	461	72
4	MeOH	393	473	80
5	H ₂ O	399	503	104

Das Aminocumarin FFN **15** zeigt einen leichten solvatochromen Effekt (Tabelle 6.3). Sowohl die Wellenlänge des Emissions- als auch die des Absorptionsmaximums nimmt mit steigender Polarität des Lösungsmittels zu, es lässt sich eine bathochrome Verschiebung beobachten.

6.2.3 Einsatz des FFN in die physiologischen Untersuchungen zur Adrenalin-Exozytose

6.2.3.1 Motivation und Messmethode

Der synthetisierte und spektroskopisch charakterisierte *false fluorescent neurotransmitter* (FFN) **15** wurde nun am Uniklinikum Homburg in physiologischen Untersuchungen eingesetzt. Die Physiologie-Arbeitsgruppe von Prof. Jens Rettig beschäftigt sich mit der Aufklärung von molekularen Mechanismen der synaptischen Transmission. Ziel hierbei ist das Verständnis, wie die Kommunikation zwischen Nervenzellen herbeigeführt und angepasst wird. Die Arbeitsgruppe studiert hierzu Vorgänge an individuellen Synapsen und erhofft sich durch die Übertragung des erlangten Wissens auf komplexere Netzwerke wie das Gehirn Erkenntnisse über die Funktion neuraler Netzwerke zu erlangen und mögliche Strategien zur Behandlung von Erkrankungen des Zentralnervensystems zu identifizieren. Zu diesen Erkrankungen zählen beispielsweise Parkinson, Alzheimer und Multiple Sklerose. Ein Teilgebiet dieser Forschung ist die Untersuchung der Rolle von Sekundärbotenstoffen in der Regulation der Chromaffinzellen- (Nebennierenzellen)-Sekretion.^[81] Chromaffinzellen lagern Neurotransmitter in kleinen Vesikeln ein und schütten diese, wie alle Neuronen, neben Hormonen und Peptiden über Exozytose aus (Abbildung 6.8). Vor der Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran gehen drei Schritte voraus:

- 1) Mobilisierung vom *reserve pool*
- 2) *Docking* : Verankerung der Vesikel an die Plasmamembran
- 3) *Priming* : membranbegrenzte Reifung

Diese vom Sekundärbotenstoff Calcium abhängige Exozytose und deren Teilschritte sollen mit Hilfe des synthetisierten *false fluorescent neurotransmitter 15* visualisiert werden. Neben der Funktion als Sonde fungiert der FFN **15** zusätzlich als Substrat für die synaptischen Vesikel-Monamin-Transporter, die für den Adrenalin-Transport in die Vesikel verantwortlich sind. Der FFN **15** kann somit als synthetisches, fluoreszierendes Adrenalinderivat aufgefasst werden, da es eine ausreichende Fluoreszenz zur Auflösung der Vesikel liefert (Anregung bei 450 nm) und gleichzeitig die normale Vesikelfunktion nicht beeinträchtigt.

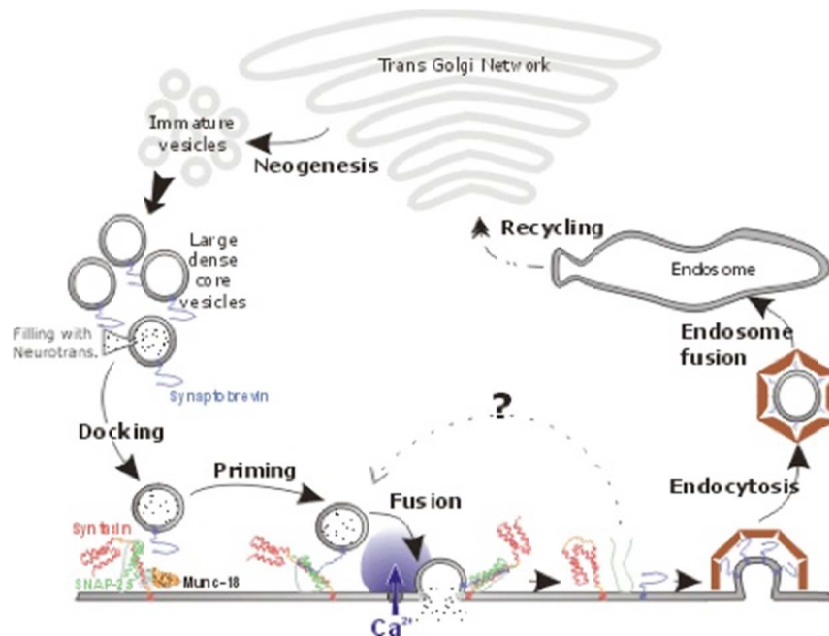
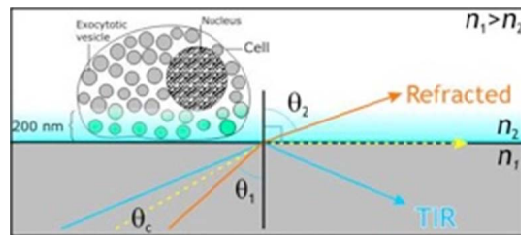


Abbildung 6.8 Schematische Darstellung der Exozytose in Chromaffinzellen.

Für ihre Untersuchungen benutzt die Arbeitsgruppe Rettig eine Kombination aus elektro-physiologischen und bildgebenden Methoden. Zur Visualisierung der Exozytose in Chromaffinzellen wird die Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: TIRFM*) herangezogen. Im Gegensatz zu elektro-physiologischen Messmethoden wie Membrankapazitätsmessungen oder Carbonfaser Amperometrie ermöglicht TIRFM die Verfolgung von einzelnen Vesikeln vor (Docking, Priming) und während der Exozytose in Echtzeit. TIRFM ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, bei der die Fluoreszenz eines Präparats über ein evaneszentes Feld angeregt wird.^[141] Zur Erzeugung dieses evaneszenten Feldes wird ein Laserstrahl an der Grenze vom Deckglas (*Coverslip*), auf dem die Chromaffinzellen kultiviert werden, zum Präparat totalreflektiert (Abbildung 6.9). Die Reflexion generiert ein sehr dünnes, elektromagnetisches Feld an der Zellseite des *Coverslips*, welches die gleiche Frequenz wie das eingefallene Licht hat.

Abbildung 6.9 Schematische Darstellung der TIRFM.^[141]

Ein Vorteil einer solch milden Bestrahlung ist die deutlich geringere Lichtmenge bei der Exposition der Zellen. Im Gegensatz zum *Imaging* mit Epifluoreszenzmikroskopie (Laserwinkel 61°) trifft der Laserstrahl in einem sehr flachem Winkel von 80° auf das Trägerglas, wodurch ein 2000-fach niedrigerer Hintergrund erhalten wird. Das daraus resultierende hohe Signal-Hintergrund-Verhältnis stellt einen weiteren Vorteil der TIRFM da.

6.2.3.2 Visualisierung der Exozytose

Die zur Exozytosevisualisierung verwandten Chromaffinzellen wurden entweder aus Nebennieren vom Rind oder der Maus präpariert und auf einem *Coverslip* kultiviert (durchgeführt von Sandra Magin, Physiologie Homburg). Die Zellen wuchsen an das Glas an und der *Coverslip* konnte für die mikroskopischen Untersuchungen in das Mikroskop eingebaut werden. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen mit einem Laser bestrahlt, so dass der FFN **15** die Energie absorbierte, angeregt wurde und schließlich Fluoreszenzlicht emittierte (durchgeführt von Dr. Ute Becherer, Physiologie Homburg). Das emittierte Licht wurde durch eine Kamera detektiert, die sekundlich Bilder aufnahm und diese zu einem Film aufsummierte. Auf diese Weise wurden die fluoreszierenden Vesikel sichtbar. Die Visualisierung setzte sich aus drei Teilschritten zusammen: dem Laden des FFN, dem Waschen und der eigentlichen Exozytose-Beobachtung. Die Aufnahmen der einzelnen Schritte wurden entweder in Epifluoreszenz oder in TIRFM aufgenommen.

Im ersten Schritt der Exozytosevisualisierung wurden die bovinen Chromaffinzellen mit dem synthetischen, fluoreszierenden Adrenalinderivat FFN **15** beladen. Hierzu wird eine $5\ \mu\text{M}$ Lösung des FFN in einem extrazellulären Medium, das aus NaCl (155 mM), KCl (1.8 mM), MgCl_2 (2 mM), Glucose (10 mM) und HEPES (5 mM) bestand, auf das *Coverslip* mit den präparierten Zellen pipettiert. Eine $5\ \mu\text{M}$ FFN-Konzentration erwies sich für die Analyse als ideal, da sowohl ausreichende Fluoreszenzintensität als auch ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis erhalten wurde. Der Ladeprozess wurde 20 min bei Epifluoreszenz aufgenommen. In dieser Zeit diffundierte der FFN **15** über einen Membrantransporter zuerst ins Cytosol und dann über einen zweiten Transporter (vesikulärer Monoamintransporter (VMAT)) in die Vesikel (Abbildung 6.10). Der VMAT erkannte das Monamin bzw. in diesem Fall den FFN in der cytosolischen Seite der Vesikelmembran und unterzog sich einer Konformationsänderung, die das Monamin ins Vesikellumen transportierte.^[142]

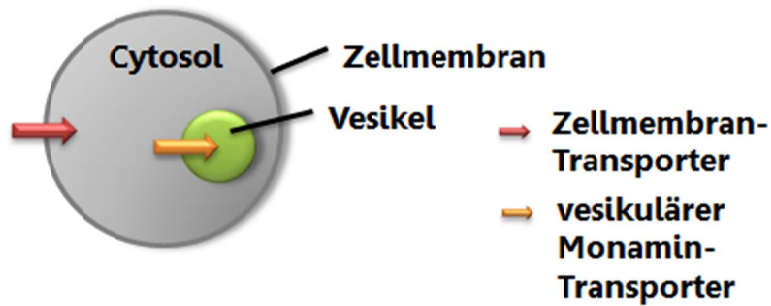


Abbildung 6.10 Der Weg des FFN 15 in die Chromaffinzellen-Vesikel.

Nach dem Laden wurde mit Hilfe von Perfusion der überschüssige FFN, der nicht in die Vesikel diffundiert war, ausgewaschen. Das Waschen wurde ebenfalls mit Epifluoreszenzmessungen verfolgt (Abbildung 6.11, Bild 1). Im letzten Schritt der Visualisierung wird durch Zugabe von Dimethylpyrazolphosphat (DMPP), das die nicotinergen Acetylcholin-Rezeptoren aktiviert, die Sekretion des FFN 15 stimuliert. Diese Zugabe erfolgte durch Perfusion über 10 s mit 20 μM DMPP in einem Abstand von 300 Sekunden. Die Aufnahme der Exozytose-Stimulation erfolgte bei TIRF-Einstellungen. Mit Hilfe der Kamera (alle 100 ms ein Bild) lässt sich bei voranschreitender Exozytose eine Abnahme der fluoreszierenden Vesikel beobachten. Anhand der Bilder zeigte sich, dass bereits nach 100 ms kaum Fluoreszenz zu erkennen war. Die TIRF-Mikroskopie ermöglicht somit die Verfolgung der Exozytose bzw. des Sekrets während der Vesikelfusion.

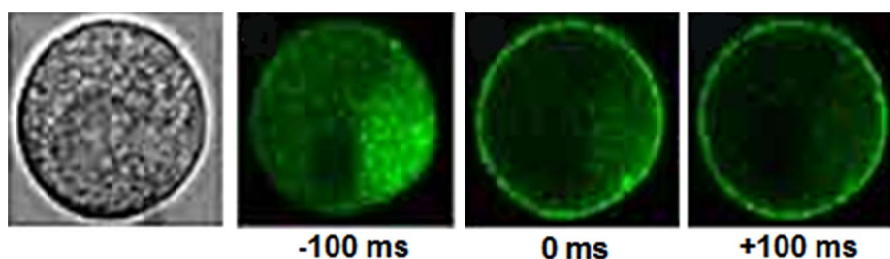


Abbildung 6.11 Exozytose eines bovinen Chromaffinzellenvesikels. Aufnahme 100 ms vor und 100 ms nach der Vesikelfusion.

6.3 Synthese und Charakterisierung verschiedener cumarinbasierter Fluoreszenzfarbstoffe

Die Verfolgung der FFN-Sekretion lieferte gute Ergebnisse (Kap. 6.2.3). Der FFN 15 erwies sich als geeignete Fluoreszenzsonde, die ausreichende Fluoreszenz zur Auflösung der Vesikel liefert und gleichzeitig die normale Vesikelfunktion nicht beeinträchtigt. Jedoch gestaltete sich die Visualisierung der Exozytose für bestimmte Messungen wie das *Calcium Imaging* noch schwierig. Die Arbeitsgruppe von Prof. J. Rettig entwickelte ein komplexes Detektionssystem zur Exozytose-Beobachtung, das neben dem FFN 15 auch Ca^{2+} -Ionen über die Fluoreszenz detektierten und quantifizieren kann. Die Detektion und Quantifizierung von

Calcium-Ionen ist relevant, da die Sekretion von Neurotransmittern an der Synapse durch Ca^{2+} -getriggerte Exozytose erfolgt. Durch einen äußeren Reiz wird die Plasmamembran depolarisiert, die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle öffnen sich und es kommt zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Endknöpfchen. Die Erhöhung der intraterminalen Ca^{2+} -Konzentration durch das Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen führt zu einer Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran und der Neurotransmitter wird freigesetzt. Zusätzlich zu den Fluoreszenzmessungen wird in dem Detektionssystem gleichzeitig die Membrandiffusion erfasst. Bei der Detektion der beiden Fluoreszenzen treten allerdings Probleme auf, da sich das Emissionsspektrum des Calciumionen-Indikators (Fura2, breites Spektrum um 510 nm) mit dem des grünfluoreszierenden FFN **15** (454 nm) überschneidet. Eine Quantifizierung über die Fluoreszenz ist also nicht möglich. Um diese Schwachstelle des Detektionssystems zu umgehen, sollte das Emissionsmaximum des FFN **15** zu höheren Wellenlängen verschoben werden. Hierzu muss das delokalisierte π -Systems des FFN **15** erweitert werden. Die Erweiterung des π -System ist allerdings durch die beiden zu passierenden Transporter der Zelle limitiert (siehe Kap. 6.2.3.2). Sowohl der Transporter der Zellmembran als auch der der Vesikel (VMAT) muss das FFN **15** als Adrenalin erkennen und transportieren. Die Funktionsweise beider Transporter ist nicht literaturbekannt und lässt somit keine Schlüsse auf die essentiellen Strukturen des FFN **15** zu. Bei Vergleich der Struktur des Adrenalins mit der des FFN **15** zeigt sich als einzige Gemeinsamkeit die Ethylaminseitenkette (Abbildung 6.12). Um die Transporter und deren Funktionsweise näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Derivate mit unterschiedlicher Seitenkette in 4-Position des FFN synthetisiert. Einige dieser Derivate können zusätzlich als Fluoreszenzmarker (*Label*) von Aminosäuren und Peptiden Anwendung finden.

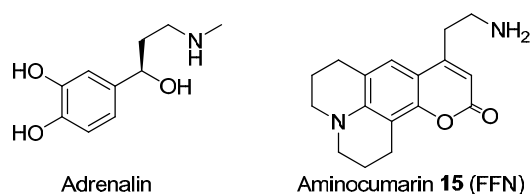
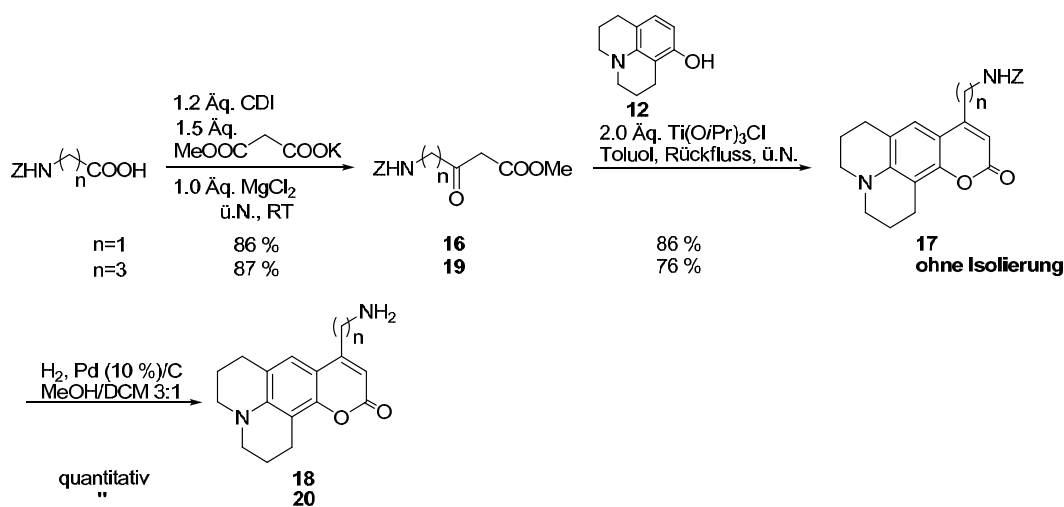


Abbildung 6.12 Strukturvergleich von Adrenalin mit dem synthetisierten FFN **15**.

6.3.1 Synthese von Aminocumarinen mit unterschiedlichen Seitenketten

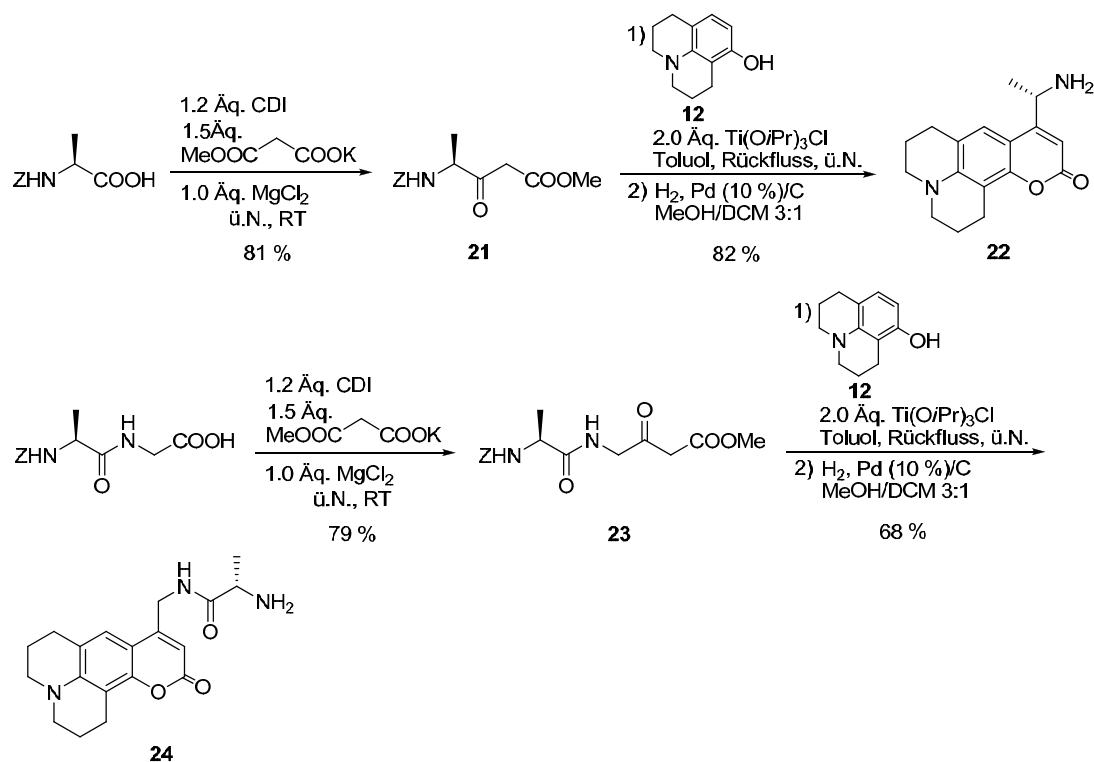
Um die Bedeutung der Ethylaminseitenkette näher zu untersuchen, wurden verschiedene Aminocumarine synthetisiert, deren Seitenketten variiert wurden. Neben der Länge der Alkylaminseitenkette wurde sowohl der sterische Anspruch als auch die funktionelle Gruppe variiert. Zur Modifikation der Seitenkettenlänge wurden ausgehend von Z-Glycin bzw. Z-4-Aminobuttersäure die analogen β -Ketoester **16** bzw. **19** hergestellt (Schema 6.4). Hierzu wurde die Carbonsäure mit Hilfe von CDI aktiviert und anschließend mit dem Kaliumsalz des

Mono-Hydrogenmethylmalonats gekuppelt (Schema 6.2). Die Synthese der beiden β -Ketoester verlief problemlos in guten Ausbeuten. Anschließend wurden die β -Ketoester **16** und **19** mit 8-Hydroxyjulodin **12** analog der entwickelten Titan-katalysierten Pechmann-Kondensation (Tabelle 6.2) zum Cumarin umgesetzt. Nach Spaltung der Carbamat-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung wurden ein Aminocumarin mit einer verkürzten Methylaminseitenkette **18** und eines mit einer verlängerten Propylaminseitenkette **20** in guten Ausbeuten erhalten. Alle Synthesen der folgenden β -Ketoester sowie deren Pechmann-Kondensation mit dem Phenol **12** wurden, soweit nicht anders erwähnt, analog der Synthese des Aminocumarins **15** (FFN) durchgeführt (siehe Schema 6.2, Tabelle 6.2).

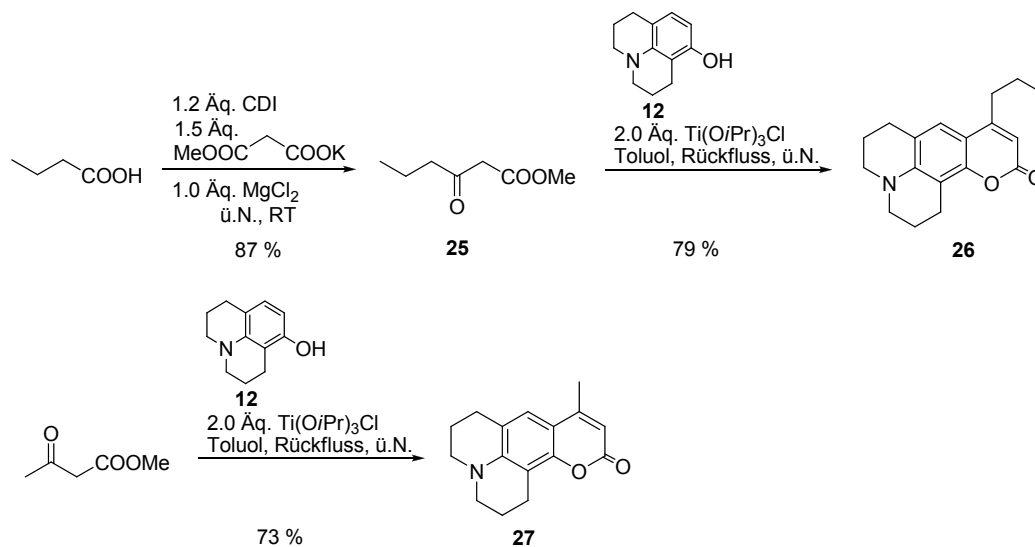


Schema 6.4 Synthese des Methylamin-Aminocumarins **18** und des Propylamin-Aminocumarins **20**.

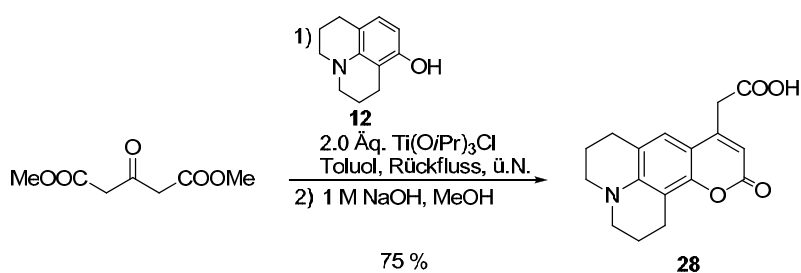
Als nächstes wurden Aminocumarine synthetisiert, deren sterischer Anspruch der Seitenkette zunimmt (Schema 6.5). Diese Derivate dienen der Untersuchung, ob die beiden Zelltransporter (Abbildung 6.10) ein sterisch anspruchsvolleres Substrat akzeptieren. Ein Aminocumarin **22** wurde durch Pechmann-Kondensation des Phenol **12** mit dem aus L-Alanin synthetisierten β -Ketoester **21** hergestellt. Sowohl die Synthese des β -Ketoesters als auch die Pechmann-Kondensation lieferten gute Ausbeuten. Für das zweite „sterisch anspruchsvolle“ Cumarin **24** wurde aus dem als Benzylcarbamatsgeschützten Dipeptid Alanin-Glycin nach bekannter Methode (Schema 6.2) der analoge Dipeptid- β -Ketoester **23** in einer Ausbeute von 79 % synthetisiert. Dieser wurde anschließend mit dem Phenol **12** zum Aminocumarin **24** kondensiert. Die Ausbeute der Pechmann-Kondensation betrug dabei 68 %. Alle bisher synthetisierten Aminocumarine (**18**, **20**, **22**, **24**) tragen eine Aminfunktion in der Seitenkette und können auch als Fluoreszenzmarker (*Label*) Anwendung finden. Das primäre Amin ermöglicht das C-terminale Fluoreszenzmarkieren von Aminosäuren und Peptiden.

Schema 6.5 Synthese der sterisch anspruchsvollen Aminocumarine **22** und **24**.

Im n\u00e4chsten Schritt wurde die Alkylaminseitenkette durch eine Alkylseitenkette in 4-Position des Cumarins ersetzt (Schema 6.6). Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die Aminofunktion f\u00fcr den Transporter essentiell ist. Der β -Ketoester **25** des ersten Alkyl-Derivates wurde aus Butters\u00e4ure hergestellt und zum Cumarin **26** kondensiert. Ein zweites Aminocumarin mit Methylseitenkette wurde durch Kondensation von Acetessigs\u00e4uremethylester mit dem Phenol **12** hergestellt. Auch bei diesen Synthesen traten keinerlei Probleme auf und die Aminocumarine **26** und **27** wurden in guten Ausbeute erhalten.

Schema 6.6 Synthese der Aminocumarine mit Alkylseitenkette **26** und **27**.

Neben Variation der Seitenkettenlänge und des sterischen Anspruchs der Seitenkette wurde die Aminfunktion durch eine andere funktionelle Gruppe ersetzt. Mit Hilfe dieses Derivats konnte ebenfalls untersucht werden, ob die Aminfunktion des FFN **15** für den Zelltransport essentiell oder gegen eine andere Funktionalität austauschbar ist. Hierzu wurde ein Aminocumarin mit einer Säurefunktion in der Seitenkette hergestellt (Schema 6.7). Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Dimethylaceton-1,3-dicarboxylat wurde durch Pechmann-Kondensation mit 8-Hydroxyjulodin **12** das Säurederivat **28** mit guten Ausbeuten erhalten. Dieses Aminocumarin **28** ermöglicht nicht nur die Untersuchung der beiden Zelltransporter, sondern kann außerdem zum *N*-terminalen Fluoreszenzmarkieren von Aminosäuren und Peptiden eingesetzt werden.



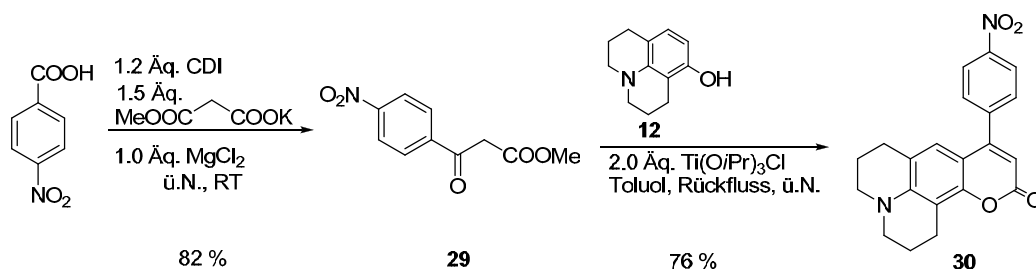
Schema 6.7 Synthese des Aminocumarin **28** mit Säurefunktion in der Seitenkette.

6.3.2 Synthese von Aminocumarinen mit erweitertem π -System

Nach der Synthese der unterschiedlichen Aminocumarinderivaten zur Charakterisierung der Transporter und deren Funktionsweise wurde im Folgenden das delokalisierte π -System des FFN erweitert. Die Erweiterung erfolgte in 3- und in 4-Position des Cumarinrings und soll das Emissionsmaximum des FFN **15** zu größeren Wellenlängen verschieben. Besonders günstig auf die Fluoreszenz wirkt sich ein elektronenschiebender Rest auf der einen Seite des delokalisierten Systems und einen elektronenziehender Rest auf der anderen Seite aus. In unserem Fall ist durch die Aminogruppe in 7-Position ein elektronenschiebender Rest gegeben. Im Zuge der π -Systemerweiterung soll zusätzlich ein neues Element mit elektronenziehender Gruppe eingeführt werden.

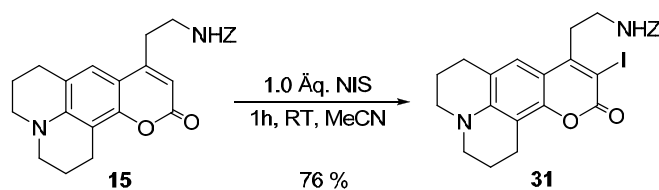
6.3.2.1 π -System-Erweiterung in 4-Position des Aminocumarins

Zuerst wurde das π -System in 4-Position des Cumarinrings durch Austausch der Ethylaminseitenkette gegen einen aromatischen Ring mit elektronenziehendem Nitro-Substituent erweitert (Schema 6.8). Ausgehend von *p*-Nitrobenzoesäure wurde der β -Ketoesters **29** hergestellt und dieser unter Einsatz von $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_3\text{Cl}$ mit 8-Hydroxyjulodin **12** zum 4-substituierten Cumarin **30** kondensiert. Die Synthese des β -Ketoester **29** als auch die Cumarin-Kondensation verliefen mit guten Ausbeuten. Allerdings zeigte dieses erweiterte Aminocumarin **30** keinerlei Fluoreszenz (siehe Kap. 6.3.3.1). Die leicht zu variierende 4-Position scheint nicht für die Erweiterung des π -System geeignet.

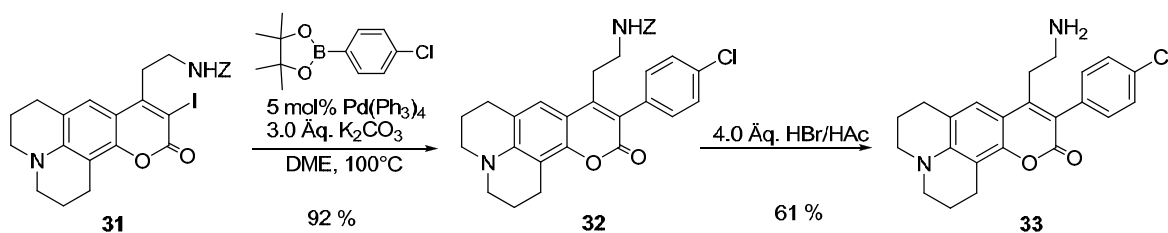
Schema 6.8 Synthese des in 4-Position erweiterten Aminocumarins **30**.

6.3.2.2 π -System-Erweiterung in 3-Position des Cumarins

Die π -System-Erweiterung in 4-Position des Aminocumarins führte nicht zum Erfolg. Statt der Verschiebung des Emissionsmaximums verschwand die Fluoreszenz des Derivates **30** fast ganz. Um dennoch ein fluoreszierendes Cumarin mit zu höheren Wellenlängen verschobenem Emissionsmaximum zu erhalten, wurde als Nächstes das π -System in 3-Position erweitert. Diese Erweiterung sollte über Kreuzkupplungsreaktionen erfolgen. Um dieses Vorhaben zu realisieren, wurde das Cumarin **15** zunächst in 3-Position unter Zuhilfenahme von *N*-Iodsuccinimid iodiert (Schema 6.9). Das in der elektrophilen Iodierung erhaltene Cumarin **31** stellt ein ideales Substrat für eine Reihe von Kreuzkupplungen dar.

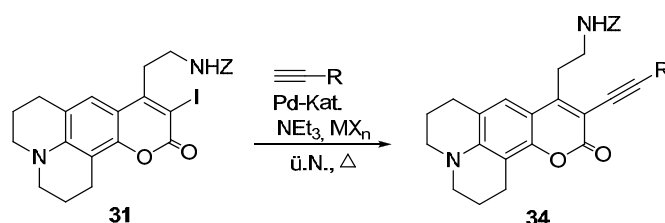
Schema 6.9 Jodierung des FFN **15**.

Als Erstes wurde das iodidierte Derivat **31** mit 2-(4-Chlorphenyl)boronsäureester in einer Suzuki-Reaktion umgesetzt (Schema 6.10). Das Kupplungsprodukt **32** wurde mit exzellenten Ausbeuten erhalten. Nach Spaltung der Benzylcarbamat-Schutzgruppe konnte das Aminocumarin **33** isoliert, spektroskopisch charakterisiert und den physiologischen Tests unterzogen werden. Die Schutzgruppe konnte allerdings nicht durch katalytische Hydrierung, sondern erst durch Einsatz von HBr in Eisessig abgespalten werden.

Schema 6.10 Synthese des erweiterten Cumarin **33** via Suzuki-Kupplung.

Als Nächstes wurde das Iod-Derivat **31** in einer Sonogashira-Kupplung eingesetzt (Tabelle 6.4). Dabei wurde das iodierter Aminocumarin **31** in Anwesenheit von CuI, einem Palladium-Katalysator und Triethylamin mit Methylpropiolat zur Reaktion gebracht.^[143] Nach Erhitzen der Reaktionsmischung über Nacht wurden lediglich Produktpuren erhalten (Tabelle 6.4, Eintrag 1). Cacchi^[144] berichtete u.a., dass elektronenarme Alkine wie z.B. Methyl- oder Ethylpropiolat in Sonogashira-Reaktionen das Kupplungsprodukt nur in sehr geringen Ausbeuten liefern. Erfolg versprach jedoch eine von Negishi^[145] entwickelte, kupferfreie Methode, die eine Kupplung von Methylpropiolat mit einem Aryliodid mit guten Ausbeuten von 78 % ermöglicht. Bei dieser Methode wird durch Behandeln eines terminalen Alkyls mit Triethylamin und Zinkbromid ein Alkylzinkreagenz generiert, welches in einer Sonogashira-Kupplung bei 60 °C reagiert. Aber auch unter Negishi-Bedingungen fand keine Reaktion statt (Eintrag 2). Aus der Reaktion ging lediglich das iodierter Derivat **31** als Edukt hervor. Um dennoch ein Kupplungsprodukt zu erhalten, wurde auf die elektronenziehende Gruppe am Alkin verzichtet und stattdessen Phenylacetylen eingesetzt (Eintrag 3). Mit Zusatz von DME als Lösungsmittel konnte schließlich das Kupplungsprodukt **34** mit einer moderaten Ausbeute von 51 % erhalten werden. Die Entschützung des Sonogashira-Produktes wurde nicht durchgeführt, da sich zeigte, dass die Verschiebung des Emissionsspektrums nicht ausreichend war und sowohl das Suzuki-Produkt **33** als auch die carbamatgeschützten Kupplungsprodukte **32** und **34** keine besseren Ergebnisse in den physiologischen Test lieferten (siehe Kap. 6.3.4).

Tabelle 6.4 Synthese eines erweiterten Aminocumarins *via* Sonogashira-Kupplung.



	R	Pd-Kat.	MX _n	Reaktionsbedingungen	Ausbeute [%]
1	COOMe	5 mol-% Pd(Ph ₃) ₂ Cl ₂	0.1 Äq. CuI	ü.N., Rückfluss	---
2	COOMe	5 mol-% Pd(Ph ₃) ₂ Cl ₂	1.2 Äq. ZnBr ₂	ü.N., 60 °C	---
3	Ph	3 mol-% Pd(Ph ₃) ₄	0.1 Äq. CuI	DME, ü.N., Rückfluss	51

6.3.3 Spektroskopische Charakterisierung aller Aminocumarine

6.3.3.1 Bestimmung der Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektren

Nach der Synthese der verschiedenen Aminocumarine wurden diese spektroskopisch charakterisiert. Hierzu wurden im Arbeitskreis von Prof. G. Jung mit Hilfe eines V650 Spektrometer der Firma Jasco die Absorptionsspektren sowie mit einem FP-6500 Spektrofluorometer von Jasco (Quarzküvette $d=1$ cm, spektroskop. reines DMSO von Merck) die Anregungs- und Emissionsspektren der Derivate gemessen. Die Messdaten wurden unter Verwendung der Software Origin 6.1 in Spektren geplottet und die jeweiligen Maxima bestimmt. Die Maxima wurden tabellarisch aufgelistet und aus diesen Daten der Stokes-Shift (siehe Abbildung 5.2) berechnet (Tabelle 6.5).

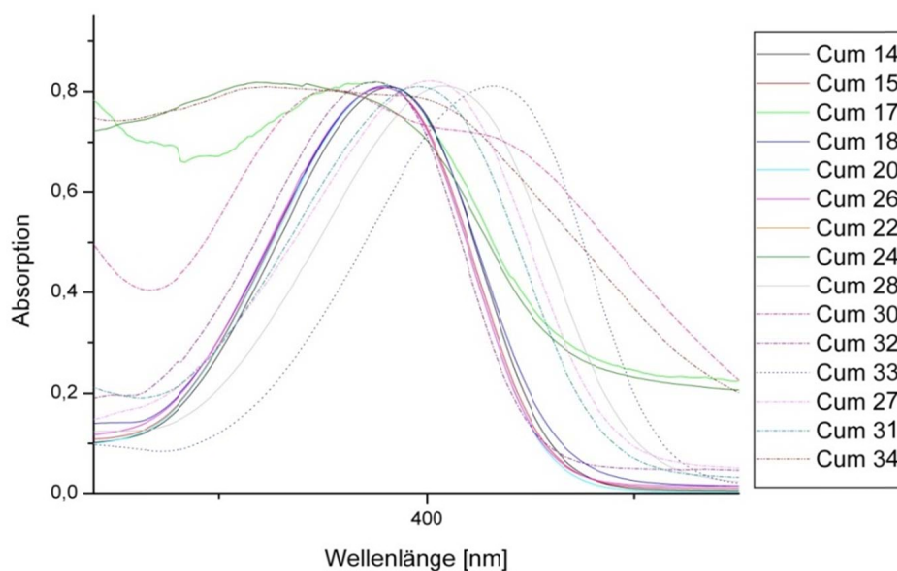


Abbildung 6.13 Absorptionsspektren aller Aminocumarine.

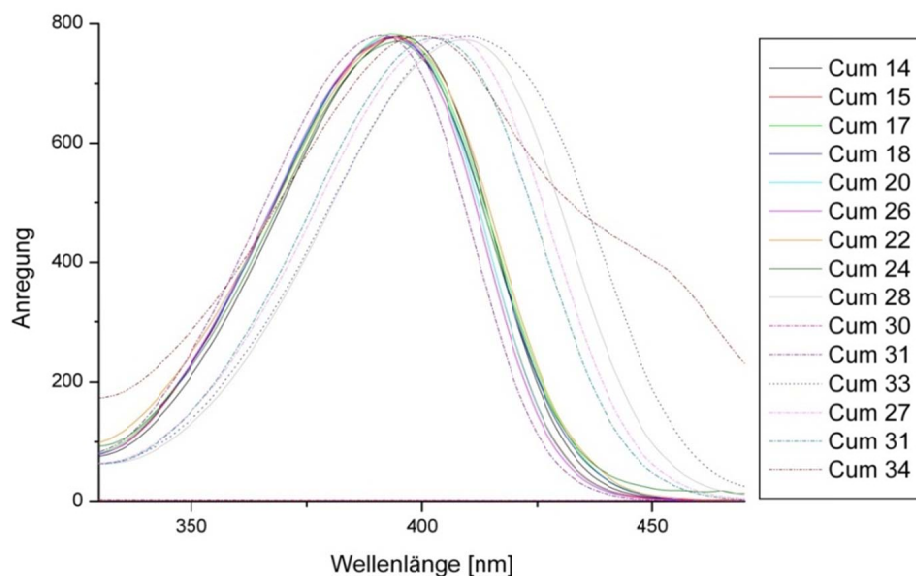


Abbildung 6.14 Anregungsspektren aller Aminocumarine.

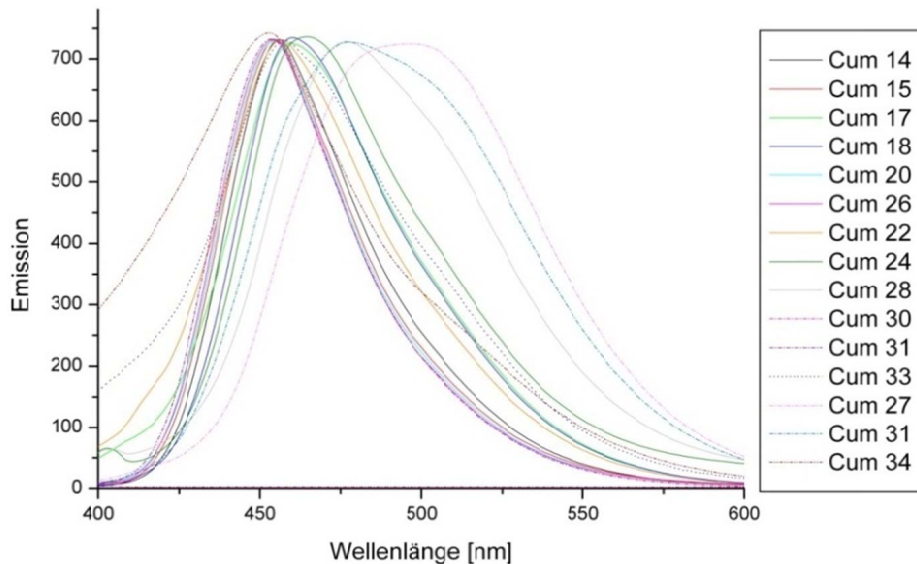


Abbildung 6.15 Emissionsspektren aller Aminocumarine.

Tabelle 6.5 Bestimmung des Absorptions-/Emissionsmaximums und des Stokes-Shifts aller Aminocumarine.

	Cumarin	$\lambda_{\text{Abs}}=\lambda_{\text{Ex}}[\text{nm}]$	$\lambda_{\text{Em}}[\text{nm}]$	Stokes-Shift ($\lambda_{\text{Em}}-\lambda_{\text{Abs}}$)[nm]
1	14	391	456	65
2	15	389	454	65
3	17	394	460	66
4	18	389	460	71
5	20	389	454	66
6	22	370	457	87
7	24	389	464	76
8	26	389	454	65
9	27	391	454	63
10	28	404	476	72
11	30	377	---	---
12	31	410	457	47
13	32	400	495	95
14	33	402	478	76
15	34	400	453	53

Sowohl die Absorptions- als auch die Emissionsspektren aller 7-Dialkyl-Aminocumarine sind sehr ähnlich. Während die Absorptionsmaxima der meisten Cumarine zwischen 389 und 404 nm liegen, stellen Cumarin **22**, Cumarin **30** und Cumarin **31** die Ausnahmen dar. Die Absorptionsmaxima der Cumarine **22** und **30** sind leicht zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Dahingegen ist das Absorptionsmaximum des Cumarins **31** minimal langwelliger verschoben (410 nm). Die Emissionsmaxima der Aminocumarine liegen hauptsächlich zwischen 454 und 464 nm, d.h im blauen Bereich des Lichts. Nur zwei Cumarine (**32** und **33**) zeigen langwelligere Emissionsmaxima. Bei den beiden Suzuki-Kupplungs-Produkten **32** und **33** zeigte die Erweiterung einen positiven Effekt auf das Emissionsmaximum. Die Maxima

sind minimal zu größeren Wellenlängen in Richtung grünen Bereich des Lichts verschoben. Die Erweiterung durch Sonogashira-Kupplung bewirkt allerdings nicht die gewünschte Verschiebung. Die Verschiebung des Suzuki-Produktes **33** ist ebenfalls nicht ausreichend, um wie gewünscht im orange-roten Bereich (ab 600 nm) des Lichts zu fluoreszieren.

6.3.3.2 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten

Unter Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f wird die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der die Anregung eines Fluorophors tatsächlich zur Emission eines Fluoreszenzphotons führt. Die Quantenausbeute ϕ_f gibt das Verhältnis zwischen Anzahl der emittierten Photonen relativ zur Zahl der absorbierten Photonen an und beschreibt die Fähigkeit eines Fluorophors, absorbierte Photonen in emittierte Photonen umzuwandeln. Der Wert liegt definitionsgemäß zwischen 0 und 1, wobei 1 für 100 % Umwandlung der eingestrahlten Energie in Fluoreszenz steht.^[79, 146] Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f lässt sich auch durch folgende kinetische Größen beschreiben:

$$\phi_f = \frac{\text{Zahl der emittierten Photonen}}{\text{Zahl der absorbierten Photonen}} = \frac{k_f}{k_f + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET}} = k_f \cdot \tau = \frac{I_F}{I_A}$$

mit: k_f = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz,
 k_{IC} = Geschwindigkeitskonstante der internen Konversion,
 k_{ISC} = Geschwindigkeitskonstante des Intersystem Crossing,
 k_{ET} = Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers,
 τ = Fluoreszenzlebensdauer,
 I_F = Intensität der Fluoreszenz,
 I_A = Intensität der Absorption.

Zur Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f eines Fluorophors sind prinzipiell zwei Methoden geeignet: die Absolut- und die Relativbestimmung. Bei der Absolutbestimmung werden die eingestrahlten und die emittierten Photonen direkt gemessen. Diese Methode ist allerdings sehr aufwendig und zeitraubend und fordert eine entsprechende Apparatur. Die Relativbestimmung hingegen benutzt die Fluoreszenzquantenausbeute einer Referenzsubstanz und vergleicht diese mit der der Probe unter analogen Messbedingungen.^[146] Die Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_f der Aminocumarine wurden mit Hilfe der Relativbestimmung von D. Auerbach (AK Prof. G. Jung) bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde der Farbstoff Cumarin 102 gewählt, der dem hier synthetisierten Methylcumarin **27** entspricht. Dieser Farbstoff und seine Quantenausbeute sind bereits literaturbekannt. Allerdings konnte keine Quantenausbeute in DMSO gefunden werden. Aus diesem Grund wurde für das Cumarin 102 eine Quantenausbeute von 0.7 in polaren Lösungsmitteln angenommen.^[147] Durch Messung der Lebenszeiten der einzelnen Cumarine und Vergleich derer mit der Lebenszeit des Cumarins 102 wurden die Quantenausbeuten prozentual als Relativwerte

berechnet. Die ermittelten Werte wurden aufgelistet und die Quantenausbeuten der 7-Aminocumarine graphisch dargestellt (Tabelle 6.6, Abbildung 6.16). Die Fluoreszenzquantenausbeuten der meisten Aminocumarine lagen im Bereich um 1. Nur die Kreuzkuppelungsprodukte (**32**, **33** und **34**) wichen leicht ab. Der Grund für die niedrigeren Fluoreszenzquantenausbeuten ist vermutlich die interne Konversion k_{IC} . Unter interner Konversion wird die Zeit verstanden, in der das angeregte Molekül durch Rotation, Schwingung usw. in den niedrigsten angeregten Zustand übergeht. Die interne Konversion k_{IC} nimmt durch die Erweiterung des Cumaringerüsts zu, da das größere Molekül mehr Zeit zur Rotation benötigt.

Tabelle 6.6 Fluoreszenzlebensdauer und -quantenausbeuten der 7-Aminocumarine.

	Cumarin	Lebenszeit [ns]	Relative ϕ_f zu MeFFN
1	14	4,1	1,0
2	15	3,9	1,0
3	17	4,4	1,1
4	18	4,1	1,0
5	20	3,9	1,0
6	22	4,3	1,0
7	24	4,4	1,1
8	26	3,9	1,0
9	27	3,9	1,0
10	28	4,3	1,1
11	30	---	---
12	31	3,9	1,0
13	32	3,4	0,8
14	33	3,4	0,8
15	34	3,4	0,8

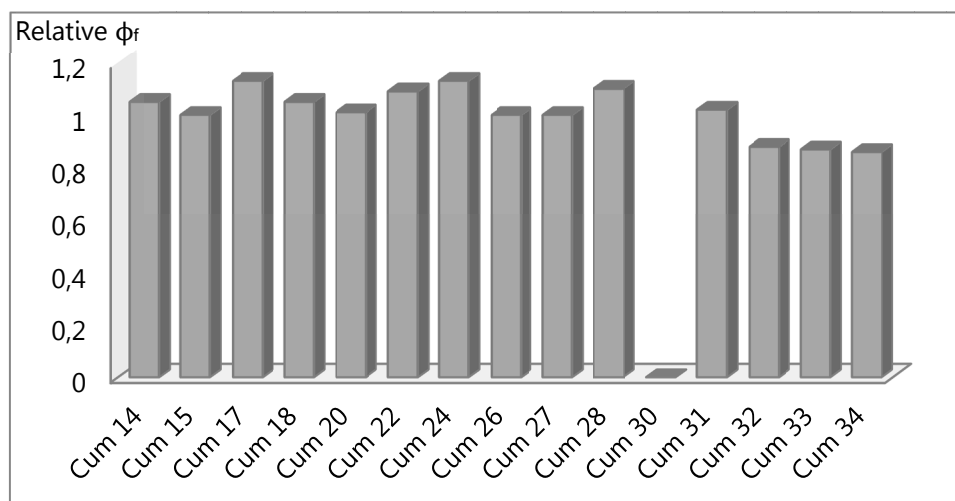


Abbildung 6.16 Relative Fluoreszenzquantenausbeuten der Aminocumarine.

6.3.4 Einsatz der Aminocumarine in das biologische Testsystem

Die synthetisierten Aminocumarin-Derivate wurden analog des FFN **15** physiologischen Untersuchungen unterzogen (siehe Kap. 6.2.3.2). Die Derivate wurden in die kultivierten Chromaffinzellen geladen, überschüssiges Derivat durch Perfusion ausgewaschen und die Zellen unter dem TIRF-Mikroskop beobachtet. Neben dem FFN **15** wiesen nur vier Derivate eine bedeutende Aufnahme in die Zelle auf. Cum **18**, Cum **20**, Cum **22** und Cum **33** wurden in die Chromaffinzellen *via* Membrantransporter transportiert während die anderen Derivate kaum von den Zellen aufgenommen wurden. Die folgenden Abbildungen (Abbildung 6.17) zeigten die mit den Aminocumarin-Derivaten beladenen Zellen. Die Bilder sind aneinander angeglichen, um die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten abzustufen. Die Aufnahmen der Derivate zeigen im Vergleich zum FFN **15** keine richtigen Strukturen, d.h. die einzelnen Vesikel sind nicht aufgelöst.

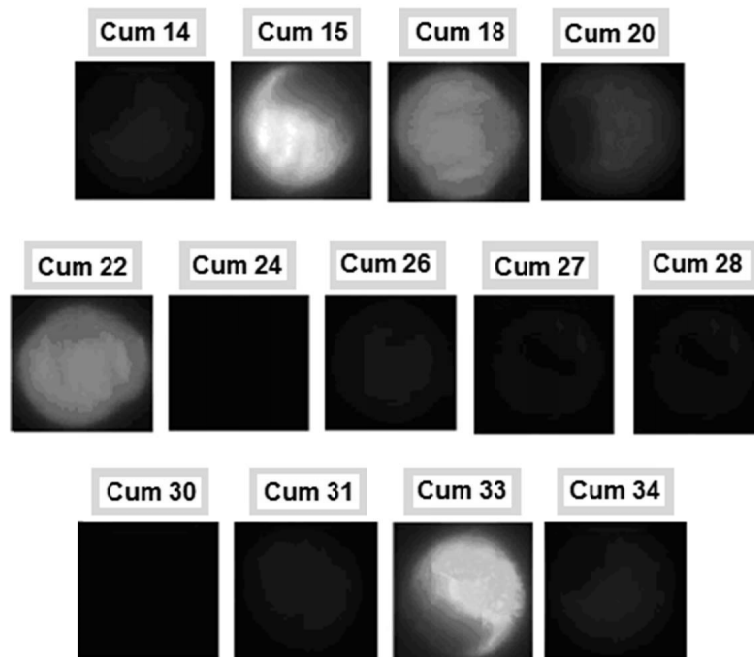


Abbildung 6.17 Bovine Chromaffinzellen nach dem Beladen mit den verschiedenen 7-Aminocumarinen.

Für den Nachweis, dass die 7-Aminocumarin-Derivate in die Vesikel transportiert wurden, mußten die Zellen gewaschen werden (Abbildung 6.18). Alle Derivate bis auf Cum **33** werden aus den Zellen ausgewaschen. Obwohl Cum **18**, Cum **20** und Cum **22** noch in der Zelle detektierbar waren, waren keine vesikulären Strukturen zu erkennen. Das „Suzuki“-Cumarin **33** wurde gut in die Vesikel geladen. Allerdings ist die vesikuläre Verteilung des Fluorophors deutlich schlechter als die Verteilung des FFN **15** und die einzelnen Strukturen werden schlechter abgebildet. Da die Verschiebung der Emissionswellenlänge des Cum **33** nicht ausreichend und die Auflösung der Vesikel schlechter ist, zeigt sich FFN **15** eindeutig als bestes Aminocumarin für die Untersuchungen zur Exozytosevisualisierung von Adrenalin in Chromaffinzellen.

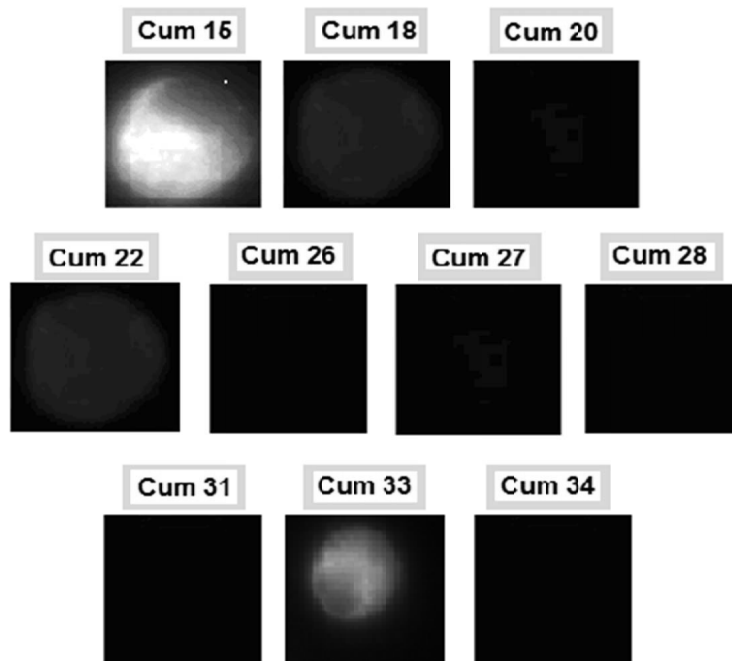


Abbildung 6.18 Bovine Chromaffinzellen nach dem Laden mit den verschiedenen 7-Aminocumarinen und dem Waschen.

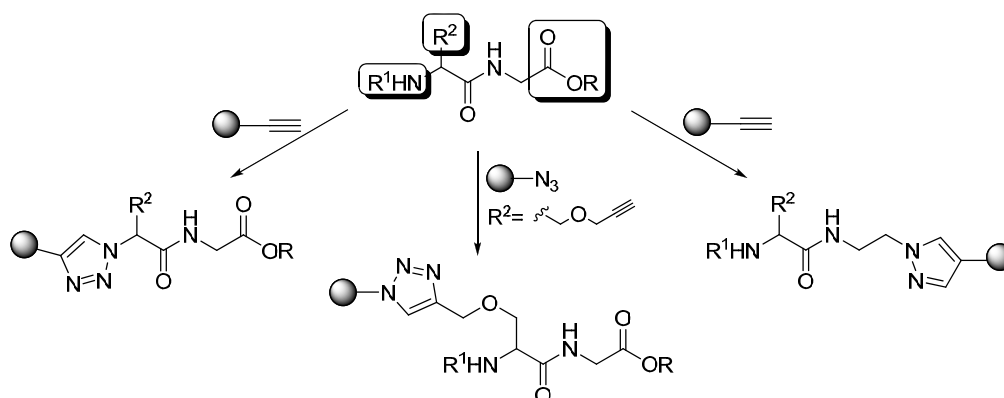
Diese Untersuchungen lassen Rückschlüsse auf die Funktionsweise der beiden Zelltransporter der Chromaffinzellen zu. Der Zellmembrantransporter ist relativ unselektiv. Für diesen Transporter scheint die Aminfunktion in der Seitenkette für den Transport in das Cytosol essentiell zu sein. Sowohl FFN **15** als auch die Cumarine **18**, **20**, **22** und **33** tragen ein endständiges Amin in der Seitenkette und werden folglich in das Cytosol transportiert. Der Vesikeltransporter (VMAT) scheint hingegen weitaus selektiver. Der VMAT erkennt ausschließlich die Aminocumarine, die eine Ethylaminseitenkette besitzen. Außer FFN **15** wird auch das Cumarin **33** in die Vesikel weitergeleitet und dort gespeichert. Alle anderen Derivate werden aus der Zelle ausgewaschen. Leider war es nicht möglich, einen *false fluorescent neurotransmitter*, der im orange-roten Bereich fluoresziert und zugleich von den Vesikeln aufgenommen wird, zu synthetisieren. Sowohl die durchgeführten Erweiterungen des π -Systems als auch deren Kompatibilität mit den Transportern sind nicht ausreichend. Besonders VMAT limitiert die Struktur des Fluorophors und ermöglicht nur die Erweiterung in 3-Position des Cumarinrings.

6.4 Entwicklung von Markierungs-Methoden von Aminosäuren und Peptiden mit 7-Dialkyl-Aminocumarin-Fluoreszenz-Labels

Wegen der enormen Komplexität zellulärer Systeme ist die Erforschung von Biomolekülen in ihrer natürlichen Umgebung eine anspruchsvolle Aufgabe. Durch Forschung auf dem Gebiet des molekularen *Imaging* konnten Neuerungen wie das genetisch kodierte, grünfluoreszierende Protein (GFP), dessen weit verbreitete Anwendung und Bedeutung im Jahr 2008 mit dem Nobelpreis in Chemie anerkannt wurde, erzielt werden. Allerdings können viele Biomoleküle nicht mit genetisch kodierten Fluoreszenzmarkern beobachtet werden. Aus diesem Grund hat sich ein Bereich der *Life Sciences* zum Ziel gesetzt, diese Biomoleküle mit Hilfe bioorthogonaler, chemischer Reaktionen zu erforschen. Diese Reaktionen müssen unter physiologischen Bedingungen mit hoher Geschwindigkeit ablaufen und inert gegenüber zahlreichen *in vivo* vorkommenden Funktionalitäten (OH, COO⁻, NH₃⁺, S-S,...) sein.^[84] Das Spektrum an bioorthogonalen Reaktionen ist bisher begrenzt, weshalb es wichtig ist, neue Techniken zu entwickeln, die das Anbringen kleiner organischer Fluorophore an Biomoleküle ermöglichen.

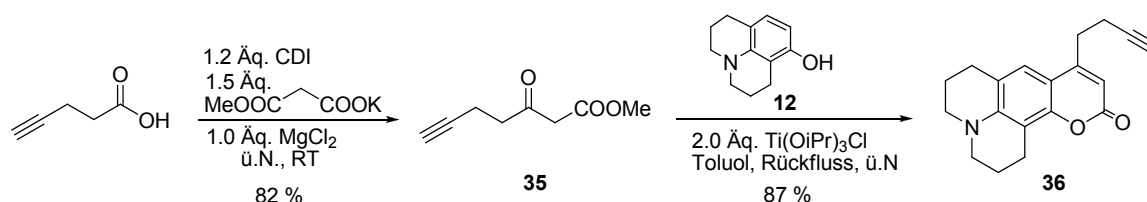
6.4.1 Markierung durch Kupfer-katalysierte Azid-Acetylen-Click-Chemie

Die Kupfer-katalysierte Huisgen-Meldal-Sharpless-Click-Reaktion (Abbildung 5.14, Schema 5.1) zeichnet sich aufgrund ihrer milden Bedingungen und der Toleranz vieler funktioneller Gruppen als hervorragendes Werkzeug für die Fluoreszenzmarkierung von biologisch aktiven Substanzen wie Proteinen aus. Diese simple und effiziente Reaktion liefert das markierte Produkt in nahezu quantitativer Ausbeute und weist eine Orthogonalität zu herkömmlichen Methoden sowie eine Bioorthogonalität auf. Zudem stellt diese Click-Reaktion eine vielseitige Methode dar, da sie das Anbringen des Fluoreszenz-Labels an drei Positionen des Peptids – N-, C-Terminus oder Peptidseitenkette – ermöglicht (Schema 6.11). Hierzu muss entweder das Peptid die Azidfunktion und das Label die terminale Acetylenfunktion tragen oder umgekehrt.

Schema 6.11 Mögliche Markierungspositionen *via* Click-Chemie.

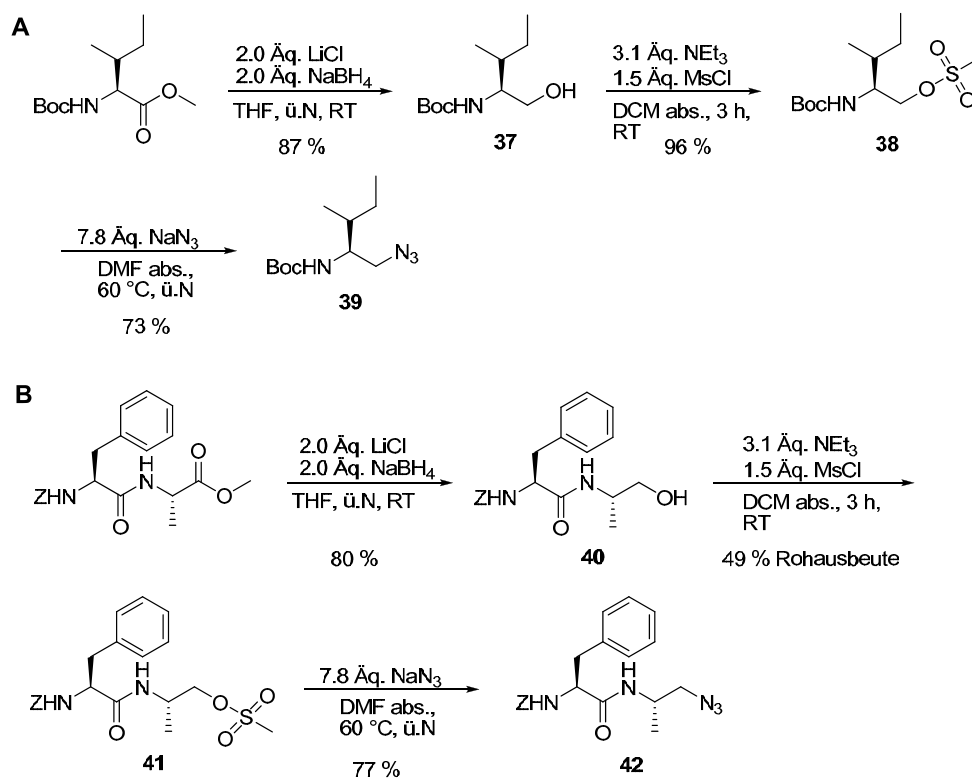
6.4.1.1 C- und N-terminale Fluoreszenzmarkierung

Um den C- und N-Terminus von Aminosäuren und Peptiden mit 7-Aminocumarinen fluoreszenzmarkieren zu können, sollte der jeweilige Terminus in ein Azid überführt und anschließend mit einem *Label* mit terminalem Acetylenrest zur Reaktion gebracht werden. Hierzu wurde im ersten Schritt unter Zuhilfenahme der zuvor entwickelten Titan-katalysierten Pechmann-Kondensation (Tabelle 6.2) ein *Label* mit terminaler Acetylenfunktion synthetisiert. Sowohl die Synthese des β -Ketoesters **35** aus Pent-4-insäure als auch die Pechmann-Kondensation verliefen mit guten Ausbeuten (> 80 %).



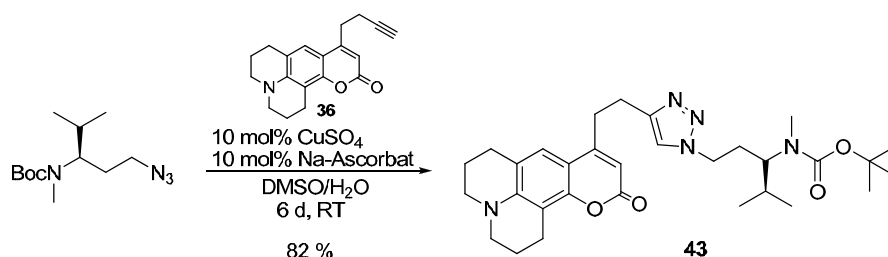
Schema 6.12 Synthese eines 7-Aminocoumarin-Labels mit terminalen Acetylenseitenkette.

Das hergestellte Alkinderivat **36** wurde nun zum C-terminalen Markieren von Aminosäuren und Peptiden verwendet. Als Erstes wurde der C-Terminus der jeweiligen Aminosäure bzw. des Peptids in ein Azid umgewandelt. Durch Reduktion des Esters mit Natriumborhydrid in Anwesenheit von Lithiumchlorid wurde der entsprechende Alkohol **37** erhalten,^[148] der in das analoge Mesylat **38**^[149] und anschließender in das Azid **39**^[150] überführt wurde (Schema 6.13, A). Dabei zeigte sich, dass das Mesylat instabil ist und schnell mit Natriumazid zur Reaktion gebracht werden muss. Trotz der Instabilität des Mesylats konnte das Azid mit guten Ausbeuten isoliert werden. Mit dieser Methode wurde auch ein entsprechendes Dipeptid-Azid **42** synthetisiert (Schema 6.13, B). Die Umwandlung des Dipeptids lieferte das Azid **42** jedoch nicht mit vergleichbarer Ausbeute. Das Mesylat **41** scheint noch instabiler zu sein und zersetzt sich schnell, wodurch nur 30 % des Azids **42** über drei Stufen isoliert werden konnten.



Schema 6.13 Synthese eines C-terminalen Aminosäureazids **39** eines C-terminalen Peptidazids **42**.

Nach der Synthese des Aminosäure- **39** und Dipeptid-Azids **42** wurde nun die Kupferkatalysierte Huisgen-Meldal-Sharpless-Click-Reaktion mit dem fluoreszierenden Alkin-Derivat **36** untersucht. Als Erstes wurde ein vorhandenes Azid^[151] unter literaturbekannten Bedingungen^[152] umgesetzt (Schema 6.14). Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur sehr langsam, lieferte aber das Triazol **43** mit guten Ausbeuten. Wie erwartet, wurde unter Kupferkatalyse ausschließlich das 1,4-Addukt gebildet. Das fluoreszierende Alkin **36** wurde im leichten Überschuss eingesetzt und konnte nach der Click-Reaktion zurückgewonnen werden.

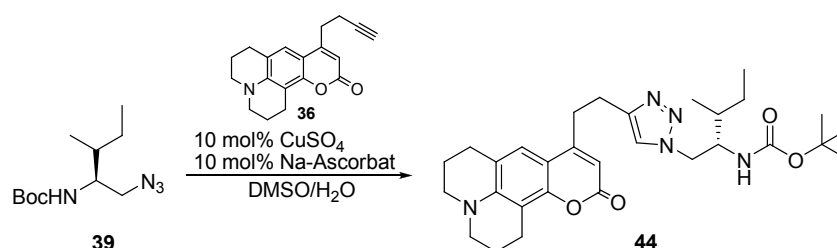


Schema 6.14 Test-Click-Reaktion zum Fluoreszenzmarkieren von Aminosäuren.

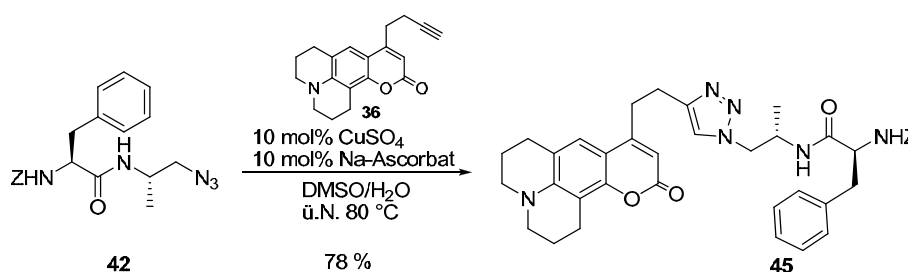
Nachdem gezeigt wurde konnte, dass das Fluoreszenz-Label **36** durch Click-Reaktion an eine Aminosäure angebracht werden kann, wurden die hergestellten Azide **39** und **42** zur Reaktion gebracht. Die Click-Reaktion des Aminosäureazids **39** wurde zuerst bei Raumtemperatur durchgeführt (Tabelle 6.7). Unter diesen Bedingungen dauert die Reaktion sechs Tage und die Ausbeute war eher moderat. Um die Reaktion zu beschleunigen, wurde die

Addition über Nacht auf 80 °C erhitzt. Dadurch konnte die Ausbeute drastisch von 25 % auf 78 % gesteigert werden. Unter Huisgen Bedingungen -Erwärmen- wird normalerweise ein Gemisch des 1,4- und des 1,5-Triazols gebildet. Das Erhitzen auf 80 °C schien in diesem Fall allerdings keinen Einfluss auf die Regioselektivität zu haben, da auch hier ausschließlich das 1,4-Addukt gebildet wurde. Nach erfolgreicher Umsetzung des Aminosäureazids **39** wurde das Dipeptidazid **42** unter den optimierten Bedingungen umgesetzt (Schema 6.15). Das 1,4-Triazol **45** konnte ebenfalls mit guten Ausbeuten isoliert werden.

Tabelle 6.7 Click-Reaktion des Aminosäureazids **39** mit dem Alkin-Label **36**.

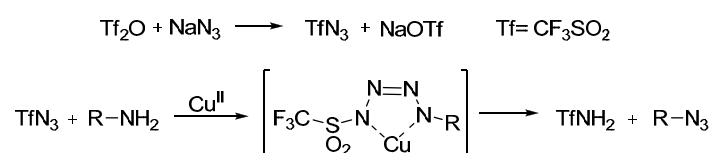


Reaktionsbedingungen		Reaktionszeit	Ausbeute [%]
1	RT	6 Tage	25
2	80 °C	ü.N.	78



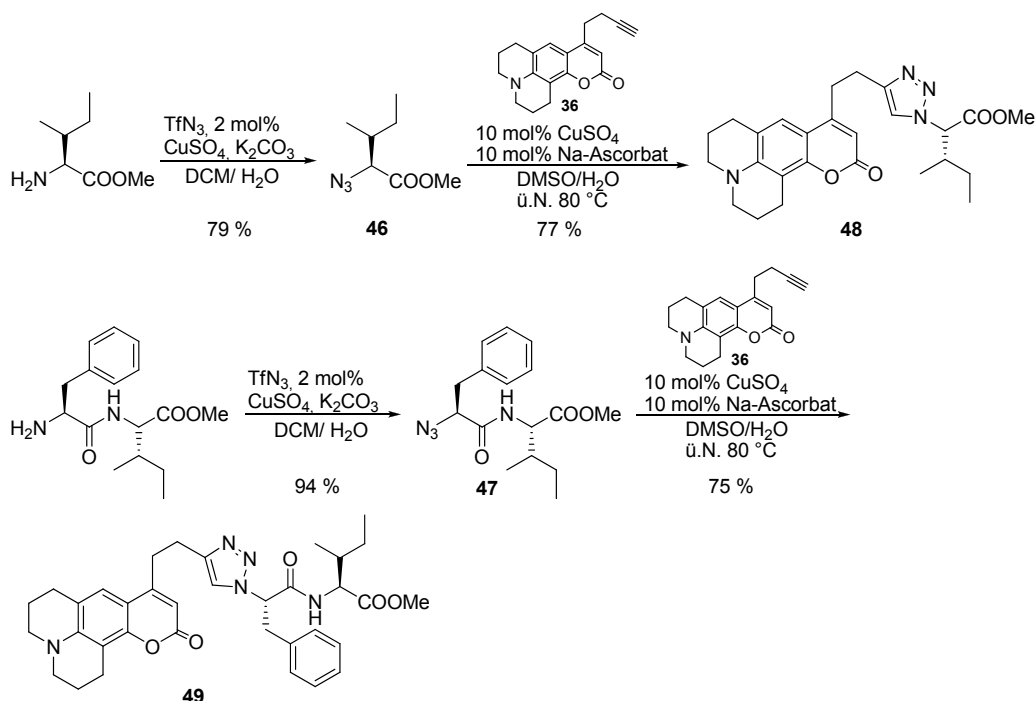
Schema 6.15 Click-Reaktion des Dipeptidazids **42** mit dem Alkin-Label **36**.

Im nächsten Schritt sollten Aminosäuren und Dipeptide *N*-terminal mit dem Fluoreszenz-Label **36** geknüpft werden. Hierzu muss die Aminfunktion des *N*-Terminus zuerst in ein Azid umgewandelt werden. Die gängigste, literaturbekannte Methode Amine in Azide zu überführen, ist der Diazotransfer mit Triflylazid, das frisch aus Natriumazid und Triflylanhydrid hergestellt werden muss.^[153, 154] Der Mechanismus des Diazotransfers nach Wong^[155] ist nicht aufgeklärt und verläuft vermutlich über ein Tetrazol (Schema 6.16).^[156]



Schema 6.16 Diazotransfer nach Wong *et al.*

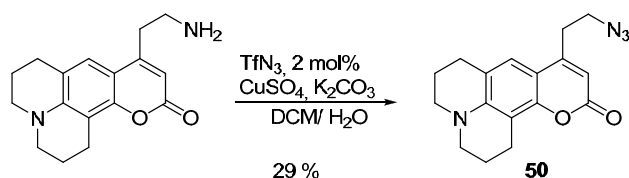
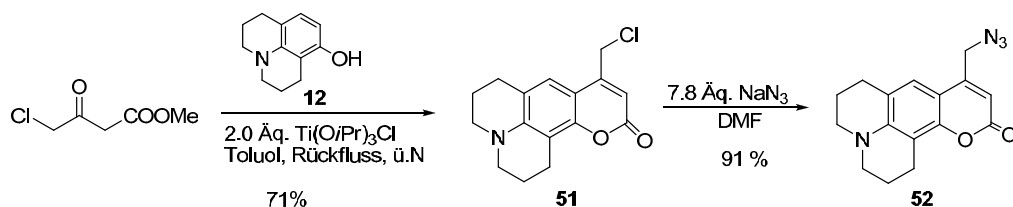
Mit Hilfe dieser Methode konnte sowohl das Aminosäureazid **46** als auch das Dipetidazid **47** mit guten Ausbeuten hergestellt werden (Schema 6.17). Anschließend wurden die beiden synthetisierten *N*-terminalen Azide **46** und **47** mit dem Alkin-Label **36** in einer Kupfer-katalysierten Click-Reaktion umgesetzt. Der *N*-Azido-Isoleucinmethylester **46** reagierte unter Erhitzen auf 80 °C mit dem Alkin **36** zum entsprechenden Triazol **48** mit einer Ausbeute von 77 %. Auch das *N*-terminale Dipeptidazid **47** konnte mit guter Ausbeute von 75 % zum Triazol **49** geklickt werden.



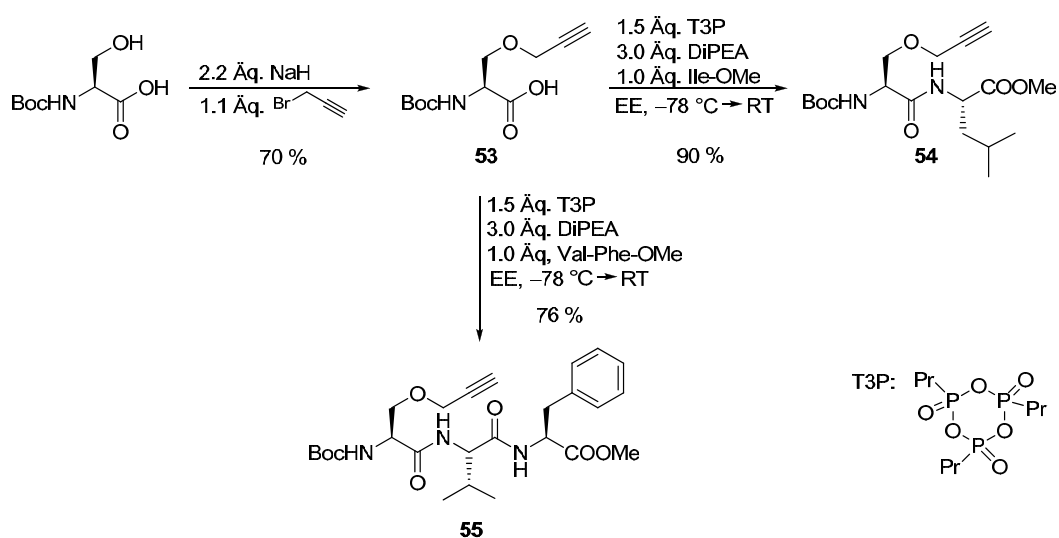
Schema 6.17 Synthese des *N*-terminalen Aminosäureazids **46** und des Dipetidazids **47** und deren Click-Reaktion.

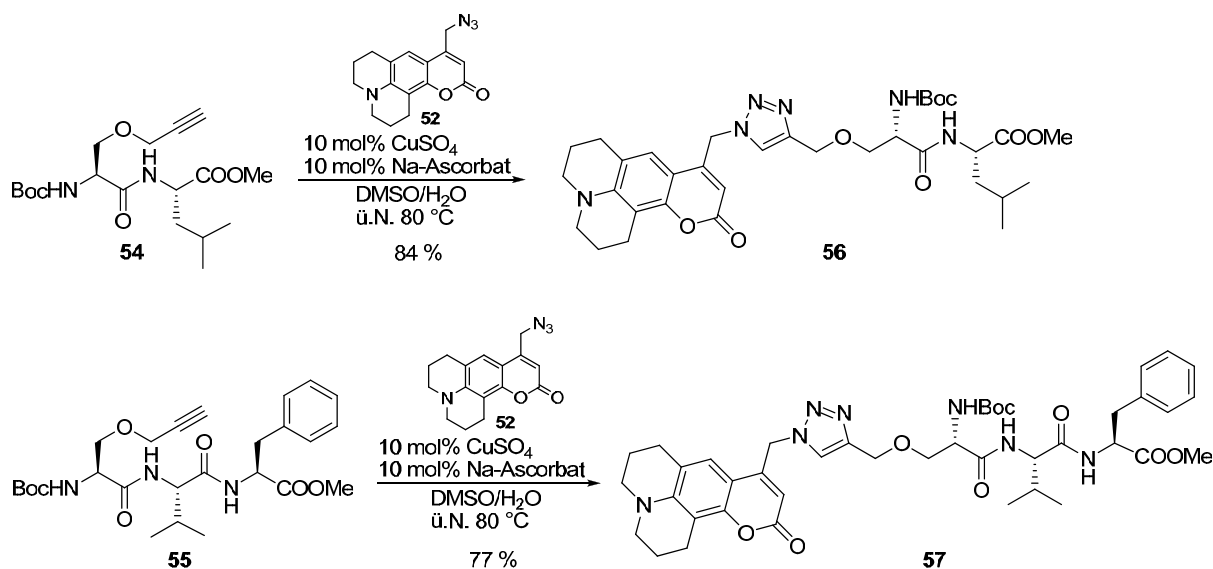
6.4.1.2 Fluoreszenzmarkierung der Seitenkette

Zur Modifizierung der Aminosäure- bzw. Peptidseitenkette wurde ein 7-Aminocumarin-Label mit Azid-Seitenkette synthetisiert. Als Erstes wurde versucht, das zuvor synthetisierte Aminocumarin **15** (FFN) mit Hilfe des Wong-Diazotransfers^[155] in das Azid zu überführen (Schema 6.18). Allerdings konnte das Azid **50** nur in präparativ unbrauchbarer Menge isoliert werden. Um dennoch ein Azid-Label in brauchbaren Mengen herstellen zu können, wurde eine alternative Syntheseroute entwickelt. Diese Route war kürzer und lieferte das Azid-Label in zwei Syntheseschritten, während die erste Variante vier Schritte benötigte (Schema 6.19). Ausgehend von 8-Hydroxyjulodin **12** und kommerziell erhältlichen Methyl-4-chlor-acetoacetat wurde nach dem entwickelten Titan-katalysierten Pechmann-Protokoll (Tabelle 6.2) ein chlosubstituiertes 7-Aminocumarin **51** aufgebaut. Das Chloorderivat **51** wurde mit Natriumazid in das Azid **52** überführt.^[157] Die verkürzte Route lieferte das Azid-Label **52** in 65 % Ausbeute über zwei Schritte und ist effektiver als die Umwandlung des Amins **15** über die Wong-Methode.

Schema 6.18 Synthese eines 4-Azidocumarins **50** via Diazotransfer nach Wong *et al.*Schema 6.19 Synthese des 4-Azidocumarins **52**.

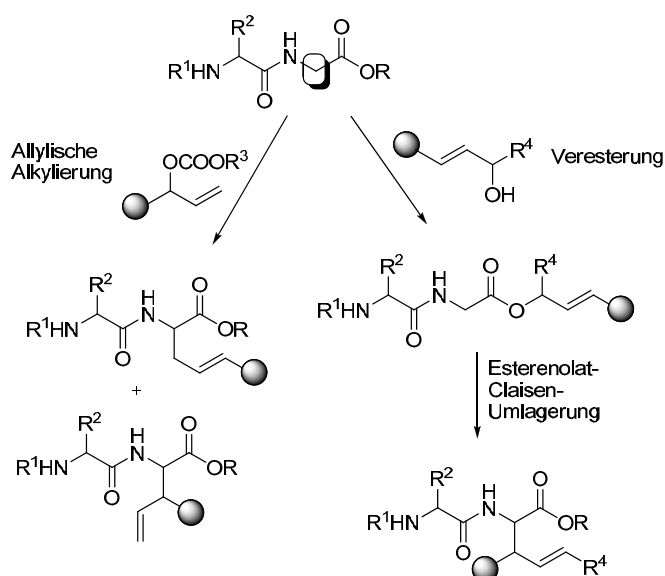
Um mit dem Azid-Label **52** nun Aminosäuren und Peptide fluoreszenzmarkieren zu können, muss zusätzlich deren Seitenkette modifiziert werden. Hierfür eignen sich besonders gut Aminosäuren wie Serin oder Tyrosin, die eine Alkoholfunktion in der Seitenkette tragen. Diese Alkoholgruppe lässt sich in den entsprechenden Propargylether überführen, der anschließend in der Click-Reaktion mit dem Fluoreszenz-Azid **52** reagieren kann. Exemplarisch wurde aus Serin ein Propargyletherbaustein synthetisiert^[158], der anschließend zum Di- bzw. Tripeptid erweitert wurde (Schema 6.20). Als Aktivierungsreagenz zur Peptidknüpfung wurde Propylphosphonanhydrid (T3P) verwendet, um eine leichtere Aufreinigung des Peptids zu ermöglichen. Während bei Verwendung von DCC Dicyclohexylharnstoff als schlecht abtrennbares Nebenprodukt entsteht, können die Nebenprodukte des T3P beim Ausschütteln mit Wasser entfernt werden. Nach Modifizierung der Peptidseitenkette wurde sowohl das Dipeptid **54** als auch das Tripeptid **55** mit dem Azid-Label **52** in der Kupferkatalysierten Click-Reaktion umgesetzt. Beide Fluoreszenzmarkierungen der Peptide **54** und **55** verliefen mit guten Ausbeuten um 80 %.

Schema 6.20 Synthese eines Di- **54** und Tripeptidpropargylethers **55**.

Schema 6.21 Markierung der Seitenkette *via* Kupfer-katalysierter Click-Chemie.

6.4.2 Markierung durch C-C-Knüpfungs-Reaktionen am Peptid-rückgrat

Alle bekannten Techniken zur Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen beruhen auf Modifizierung verschiedener Seitenketten und des *N*- bzw. des *C*-Terminus (siehe Kap. 3.2.1). Obwohl zur Modifizierung des Grundgerüsts von Peptiden verschiedene C-C-Knüpfungsreaktionen herangezogen werden können, sind bisher keine Methoden zur Markierung des Peptid-Rückgrates bekannt. Da sich die Arbeitsgruppe von Prof. Kazmaier seit vielen Jahren mit der stereoselektiven Aminosäuresynthese unter Einsatz von chelatisierten Aminosäure- und Dipeptidesterenolaten beschäftigt und deren synthetisches Potential als hochreaktive Nucleophile in einer Vielzahl an C-C-Knüpfungsreaktionen wie der Esterenolat-Claisen-Umlagerung^[13] und der Palladium-katalysierten allylischer Alkylierung^[77] zeigen konnte, sollten diese Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von Aminosäuren und Peptiden verwendet werden (Schema 6.22). Hierzu mussten speziell für die Anwendung in der Alkylierung und der Claisen-Umlagerung 7-Aminocumarin-basierte Fluoreszenz-Labels entwickelt werden.

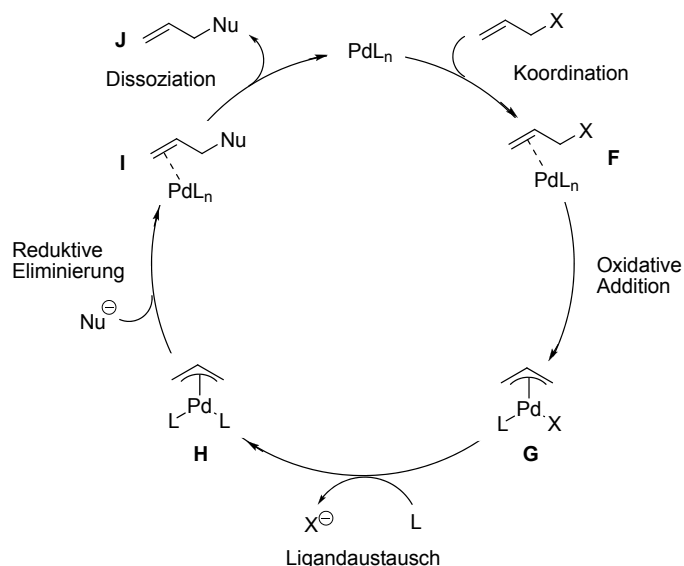


Schema 6.22 Markierung des Aminosäuren-/Peptidenrückgrates *via* C-C-Knüpfungsreaktionen.

6.4.2.1 Markierung des Rückgrates durch Palladium-katalysierte allylische Alkylierung

In den vergangenen Jahren haben vor allem die Übergangsmetall-katalysierten C-C-Knüpfungsreaktionen die Synthese und Umsetzung hochfunktionalisierter Moleküle beeinflusst.^[159] Diese Reaktionen verlaufen in der Regel unter milden Bedingungen und tolerieren dadurch eine Vielzahl an funktionellen Gruppen.^[160, 161]

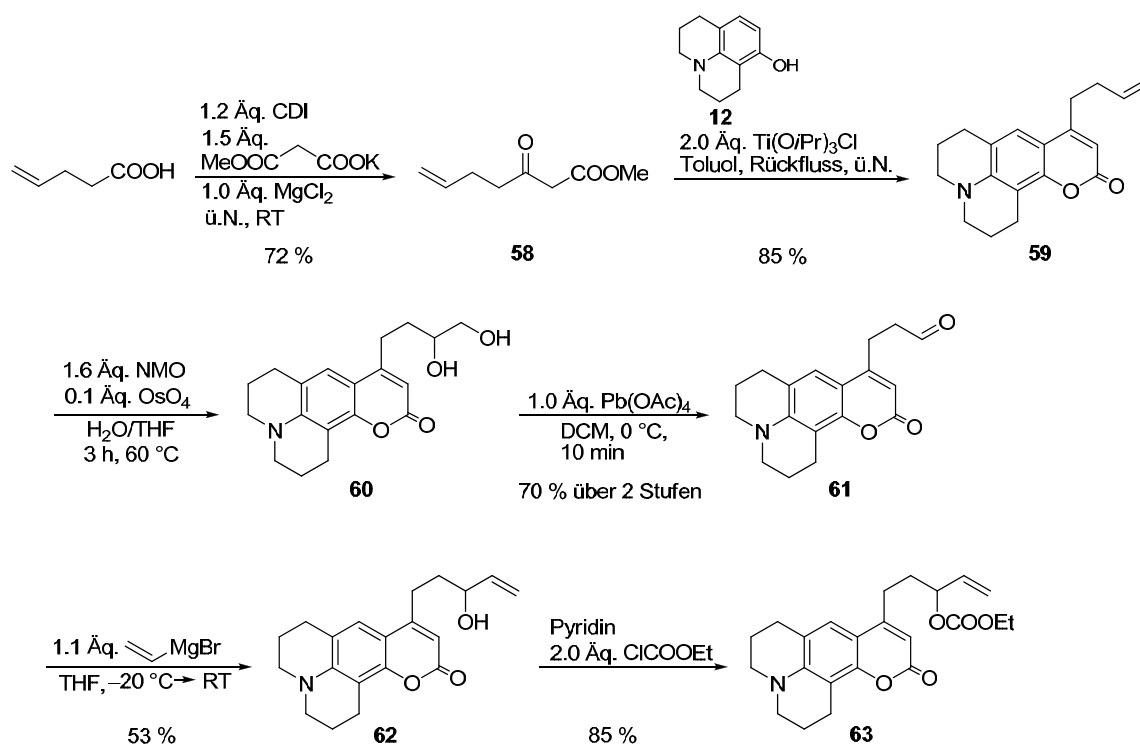
Der mechanistische Verlauf der Palladium-katalysierten allylischen Substitution lässt sich am einfachsten anhand eines Katalysezyklus beschreiben (Schema 6.23).^[162] Im ersten Schritt koordiniert die Doppelbindung des Allylsubstrats unter Ausbildung eines η^2 -Olefin-Palladium-Komplexes **F** an einen Pd^0 -Komplex. Nach Bildung eines neutralen η^3 -Allyl-Palladium^{II}-Komplexes **G** durch oxidative Addition des Palladiums in die C-X-Bindung (X= Abgangsgruppe wie z.B. Carbonat) wird über den Austausch des anionischen Liganden X mit einem Neutralliganden L (meist L= Phosphin oder Lösungsmittel) ein formal positiv geladener η^3 -Komplex **H** erhalten. Dieser kann nun aufgrund seiner im Vergleich zu Komplex **G** erhöhten Elektrophilie leicht von Nucleophilen (Nu) angegriffen werden. Unter reduktiver Eliminierung kommt es erneut zur Bildung eines η^2 -Olefin-Palladium-Komplexes **I**, welcher nach Dissoziation des Produktes **J** die katalytisch aktive Pd^0 -Spezies regeneriert, die anschließend erneut in den Katalysezyklus eintritt.



Schema 6.23 Mechanismus der Palladium-katalysierten allylischen Substitution.

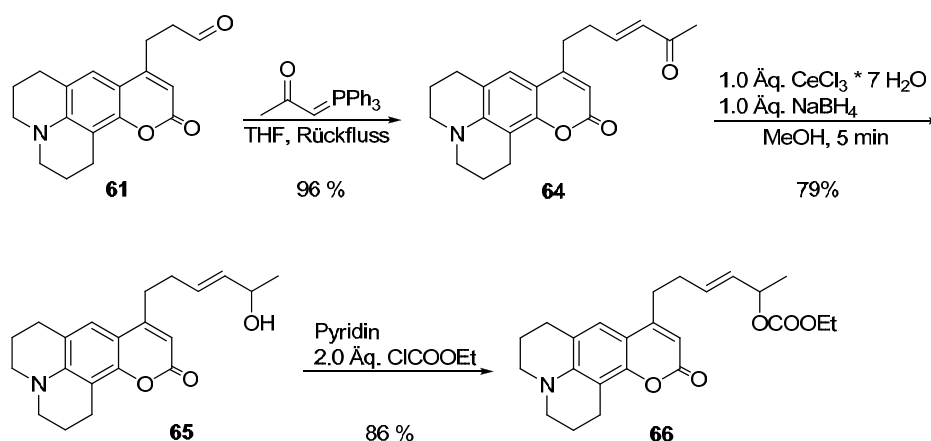
Prinzipiell können bei der allylischen Alkylierung zwei Regioisomere gebildet werden, da bei verschiedenen substituierten Allylsystemen ein Angriff des Nucleophils an zwei Positionen möglich ist. Weiche Nucleophile greifen im allgemeinen bevorzugt an der sterisch weniger gehinderten Position an, bei harten Nucleophilen beobachtet man aufgrund der Vorordination an das Palladium häufig die entgegengesetzte Regiochemie.^[163, 164] Gerade für monosubstituierte π -Allylkomplexe bedeutet dies, dass die Bindungsknüpfung überwiegend an der unsubstituierten Position des η^3 -Komplexes stattfindet, wodurch überwiegend lineares Produkt erhalten wird.

Damit Aminosäuren bzw. Peptide mittels Palladium-katalysierter allylischer Alkylierung am Rückgrat fluoreszenzmarkiert werden können, muss zuerst ein *Label* mit Allylcarbonatseitenkette hergestellt werden. Ein solches *Label* wurde über ein 7-Aminocumarin mit terminaler Alkenseitenkette **59**, das durch Titan-katalysierte Pechmann-Kondensation (Tabelle 6.2) eines von Pent-4-ensäure abgeleiteten β -Ketoesters **58** und 8-Hydroxyjulodin **12** aufgebaut wurde, synthetisiert (Schema 6.24). Sowohl die Synthese des β -Ketoesters **58** als auch die Pechmann-Kondensation verliefen mit guten Ausbeuten. Im nächsten Schritt erfolgte die *cis*-Dihydroxylierung der Doppelbindung mit katalytischen Mengen Osmiumtetroxid und *N*-Methylmorpholino-*N*-oxid (NMO).^[165] Das erhaltene Diol **60** wurde im Anschluss ohne weitere Aufreinigung mit Bleitetraacetat zum Aldehyd **61** gespalten.^[165] Aus der Dihydroxylierung und der Glykospaltung ging der entsprechende Aldehyd **61** mit einer Ausbeute von 70 % über zwei Stufen hervor. Zur Herstellung des *Labels* wurde der Aldehyd **61** schließlich in einer Grignard-Reaktion mit Vinylmagnesiumbromid umgesetzt und der erhaltene Allylalkohol **62** in das Carbonat **63** überführt. Obwohl der Aldehyd **61** in der Grignard-Reaktion vorgelegt und die Grignard-Lösung langsam zutropft wurde, konnte der Allylalkohol **62** nur in moderaten Ausbeuten isoliert werden. Dies lässt sich eventuell über die Konkurrenz zwischen der 1,2-Addition am Aldehyd und der 1,4-Addition am Michael-System des *Labels* erklären. Ein 1,4-Produkt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.



Schema 6.24 Synthese eines 7-Aminocumarins mit Allylcarbonatseitenkette **63**.

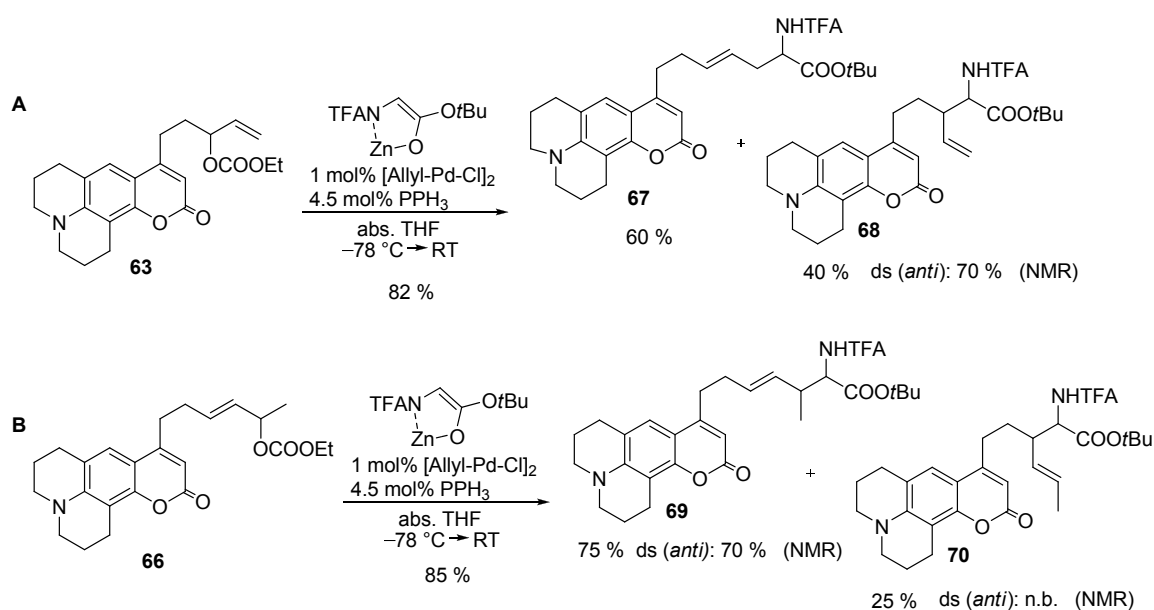
Ausgehend von Aldehyd **61** konnte ein weiteres Allylcarbonat-Label hergestellt werden. Hierzu wurde der Aldehyd **61** in einer Wittig-Reaktion zum *trans*- α,β -ungesättigten Keton **64** mit einer Ausbeute von 96 % umgesetzt (Schema 6.25).^[166] Das E:Z-Verhältnis bei dieser Reaktion betrug 100:1. Anschließend wurde das Keton **64** in einer Luche-Reduktion zum racemischen Allylalkohol **65** reduziert.^[167] Bei dieser Reaktion wird die Carbonylgruppe des Ketons mit Hilfe von Cer^{III} so stark aktiviert, dass das als Reduktionsmittel verwendete Natriumborhydrid ausschließlich die Carbonylgruppe reduziert und die Doppelbindung erhalten bleibt. Die Reduktion verlief mit einer Ausbeute von 79 %, allerdings zersetzte sich der erhaltene Allylalkohol **65** rasch. Der racemische Allylalkohol **65** bietet auch die Möglichkeit, über eine kinetische Racematspaltung mit der immobilisierten Lipase Novozym 435[®] enantiomerenrein hergestellt zu werden. Dieses Enzym, dessen natürliche Substrate langkettige Fettsäuren sind^[168], ist sehr gut zur kinetischen Racematspaltung mit längerkettigen Alkoholen geeignet und überträgt die Acetatgruppe des zugesetzten Vinylacetats auf den Allylalkohol, wobei entsprechend der Kazlauskas-Regel der (*R*)-konfigurierte Alkohol schneller umgesetzt wird als der (*S*)-konfigurierte.^[169] Zunächst wurde jedoch der racemische Allylalkohol **65** in das Carbonat **66** umgewandelt, um zu testen, ob die synthetisierten 7-Aminocumarin-Labels überhaupt in einer Palladium-katalysierten allylischen Alkylierung reagieren.



Schema 6.25 Synthese des Wittig-basierten Allylcarbonat-Labels **66**.

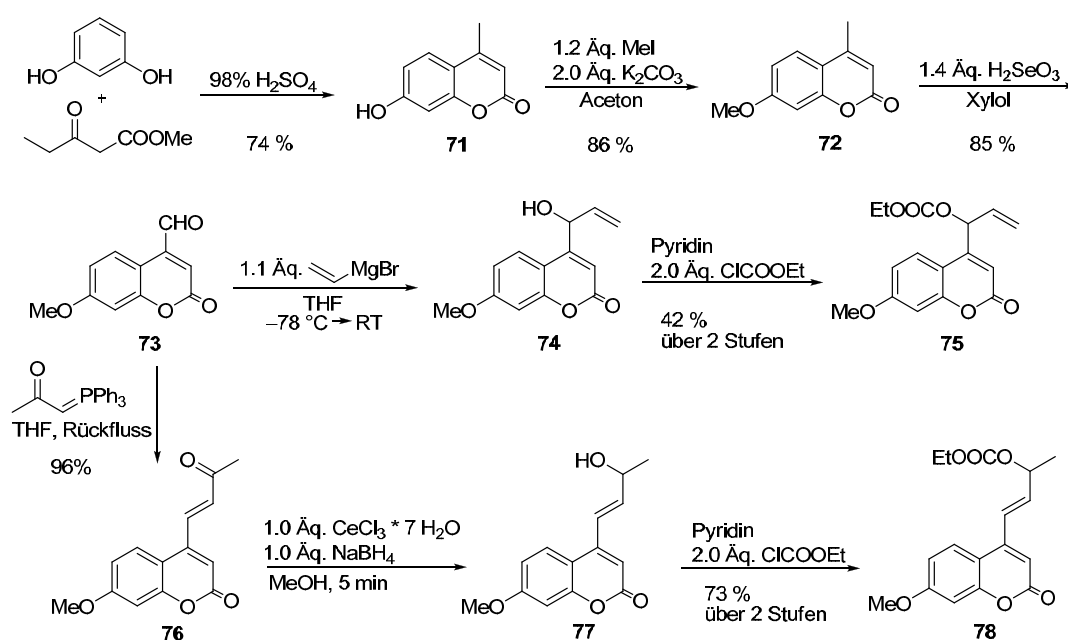
Im Anschluss an die Synthese der Allylcarbonat-Labels **63** und **66** wurden beide *Labels* in eine Palladium-katalysierte allylische Alkylierung mit dem Nukleophil TFA-Glycin-*tert*-butylester eingesetzt (Schema 6.26). Dabei erwies sich die allylische Substitutionsreaktion als hervorragende Methode zur Fluoreszenzmarkierung von Aminosäureestern. Beide allylischen Alkylierungen lieferten die fluoreszenzmarkierten Aminosäureester **67**, **68**, **69** und **70** mit einer guten Ausbeute von über 80 %. Bei der Reaktion des Carbonates **63** wurde sowohl das lineare **67** als auch das verzweigte Produkt **68** im Verhältnis 60:40 gebildet (Schema 6.26, A). Eine chromatographische Trennung der beiden Allylierungsprodukte **67** und **68** war nicht möglich. Das Gemisch der beiden Regioisomere ermöglicht jedoch keine eindeutige Bestimmung der Diastereoselektivität des verzweigten Produktes **68**. Die Selektivität kann nur grob auf 70:30 abgeschätzt werden. Die Reaktion des Carbonats **66** (Schema 6.26, B) lieferte ebenfalls beide Regioisomere **69** und **70**. Das Verhältnis der Regioisomere betrug 75:25 und auch hier war eine chromatographische Trennung nicht möglich. Zudem sind die Signale der beiden Verbindungen in dem NMR-Spektrum fast identisch.

Ähnliche Beobachtungen machten U. Kazmaier *et al.* bei der allylischen Substitution von Allylsubstraten mit TFA-Glycin-*tert*-butylester. In Untersuchungen von monoalkylierten, terminalen Allylcarbonaten, wie Carbonat **63**, und unsymmetrisch substituierten Allylcarbonaten (analog Carbonat **66**) wurden ebenfalls Gemische der beiden Regioisomeren erhalten.^[170] Zudem konnte durch Untersuchungen von F. L. Zumpe gezeigt werden, dass in allylischen Alkylierungen bevorzugt das *anti*-Diastereomer gebildet wird.^[171]



Schema 6.26 Allylischen Alkylierungen der 7-Dialkyl-Aminocoumarin-Labels **63** und **66** an TFA-Glycin-*tert*-butylester.

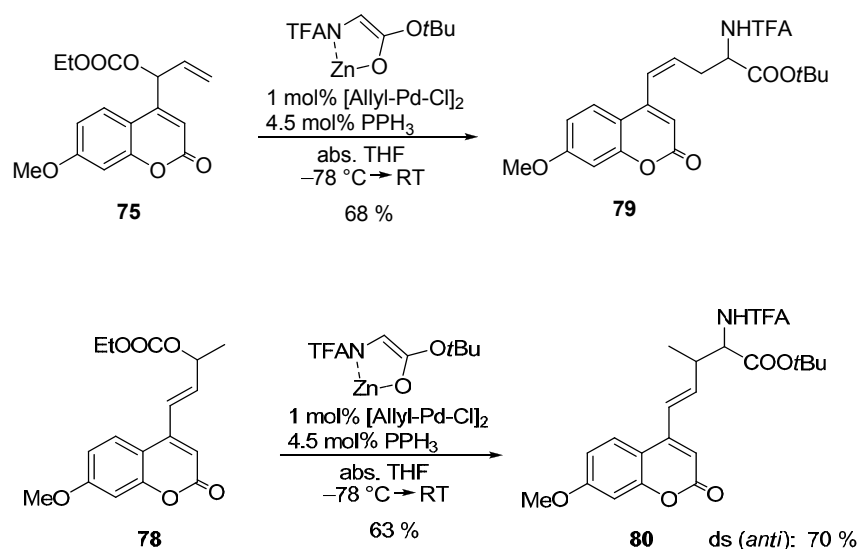
Neben den 7-Dialkylaminocoumarin-Carbonaten **63** und **66** wurden zwei analoge 7-Methoxycoumarin-Carbonate **75** und **78** synthetisiert (Schema 6.27), um zu zeigen, dass Coumarine im Allgemeinen in diese Fluoreszenzmarkierungstechnik eingesetzt werden können. Analog der Synthese von T. Wang *et al.*^[172] wurde zunächst über eine Pechmann-Kondensation, eine Methylierung des Phenols und α -Oxygenierung mit Selensäure (Riley-Oxidation) ein 4-Formyl-7-methoxycoumarin hergestellt. Der erhaltene Aldehyd **73** wurde analog der Gewinnung der Labels **63** und **66** (Schema 6.24, Schema 6.25) sowohl über eine Grignard-Reaktion als auch über eine Wittig-Luche-Reaktionsfolge in die Carbonat **75** und **78** umgewandelt.



Schema 6.27 Synthese der beiden Methoxycoumarin-Labels **75** und **78** für die allylische Alkylierung.

Auch die beiden 7-Methoxycumarine **75** und **78** wurden zur Markierung von TFA-Glycin-*tert*-butylester in die allylische Alkylierung eingesetzt und ermöglichten eine erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung mit moderaten Ausbeuten. Im Gegensatz zu den Reaktionen der 7-Aminocumarine **63** und **66** gingen aus diesen allylischen Alkylierungen in beiden Fällen ausschließlich ein Regioisomer der markierten Aminosäureester hervor. Bei Umsetzung der Carbonate **75** und **78**, die im Vergleich zu den Carbonat **63** und **66** um zwei CH₂-Gruppen verkürzt sind, wurde je nur ein Regioisomer gebildet, da hier die verzweigte Position des monosubstituierten π -Allylkomplexes für einen Angriff des Nukleophils sterisch durch den Cumarinring gehindert ist. Zudem ist dieser Angriff durch das resultierende konjugierte π -System begünstigt.

Allerdings ist die Markierung mit 7-Dialkylaminocumarinen vorteilhafter als die mit 7-Methoxycumarinen, da Aminocumarine im Gegensatz zu Methoxycumarinen bei physiologischen pH-Wert Fluoreszenz zeigen und ausgezeichnete Fluoreszenzquantenausbeuten besitzen (siehe Kap. 5.3.3.1).^[92] Damit der mit einem Methoxycumarin-*Label* markierte Glycinester mittels Fluoreszenz detektiert werden kann, muss zuerst der Methylether gespalten werden und anschließend die resultierende Alkoholfunktion bei einem pH-Wert > 10 deprotoniert werden. Im nächsten Schritt könnten nun die entwickelte Rückgrat-Markierungstechnik optimiert und auf Dipeptide übertragen werden.

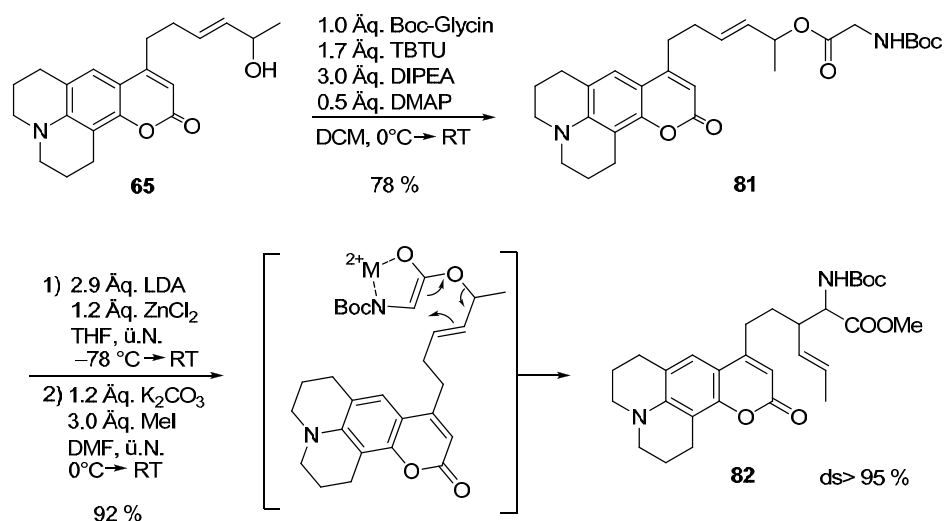


Schema 6.28 Allylische Alkylierung der Methoxycumarin-*Labels* **75** und **78**.

6.4.2.2 Markierung des Rückgrates durch Esterenolat-Claisen-Umlagerung

Das zuvor hergestellte 4-Allylalkohol-7-Aminocumarin **65** kann für eine weitere Methode zur Markierung des Aminosäure-Rückgrates herangezogen werden. Durch Veresterung des Allylalkohols **65** mit *N*-Boc-geschütztem Glycin wurde der Allylester **81** erhalten, der anschließend in einer Esterenolat-Claisen-Umlagerung eingesetzt wurde (Schema 6.29). Zur

Umlagerung des Allylesters **81** wurde dieser bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit LDA deprotoniert und mit Hilfe von Zinkchlorid in das stabile Zink-Enolat überführt.^[173] Bei Erwärmen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur lagerte sich das Enolat in die γ,δ -ungesättigte Carbonsäure um, die ohne weitere Aufreinigung mit Kaliumcarbonat und Methyljodid zum Methyl ester **82** verestert wurde. Neben hoher Ausbeute von 92 % konnte das Produkt mit sehr guter Diastereoselektivität gewonnen werden. Das NMR-Spektrum zeigte nur ein Diastereomer, wodurch eine Diastereoselektivität $> 95\%$ angenommen wurde.



Schema 6.29 Esterenolat-Claisen-Umlagerung des Allylester **81**.

Die hohe Selektivität ist im konzertierten Mechanismus der [3,3]-sigmatropen Umlagerung begründet. Bei der Deprotonierung des Allylesters **81** mit LDA wird sowohl die α -Position als auch die Boc-geschützte Aminfunktion deprotoniert, was zur Ausbildung eines mit Zink chelatisierten (*Z*)-Enolats führt. Die Geometrie des gebildeten Enolats steuert dabei die Diastereoselektivität der Esterenolat-Claisen-Umlagerung. Aufgrund der fixierten Enolatgeometrie des chelatisierten Glycinenolats, wird aus dem *trans*-Allylester selektiv das thermodynamische (*Z*)-Enolat gebildet.^[174] Dies führt dazu, dass sich bei der über einen bevorzugten sesselförmigen Übergangszustand verlaufenden Umlagerung fast ausschließlich das *syn*-Produkt bildet.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Angaben

Zur **Dünnschichtchromatographie** wurden DC-Platten (Kieselgel 60 auf TLC-PET-Folie 4x8cm) der Firma *Fluka* verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht oder Tauchreagenz (Kaliumpermanganat, Ninhydrin oder Cer-Molybdat).

Zur **Säulenchromatographie** wurden zum Teil Säulen mit Kieselgel (MN Kieselgel 60, 0.063–0.2 mm/70-230 mesh ASTM der Firma *Macherey-Nagel*) „nass“gepackt. Andererseits wurden die Verbindungen über präparative Mitteldruckchromatographie mit Hilfe eines Flashchromatographen *Reveleris*[®] Flash System (UV- und ELSD-Detektor) der Firma *Grace* aufgereinigt.

¹H-NMR-Spektren wurden mit einem 400 MHz-Kernresonanzspektrometer (*Bruker AVII 400*) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde, soweit nicht anders erwähnt, Deuteriochloroform verwendet. Die Kalibrierung erfolgte in Bezug auf das verwendete Lösungsmittel (CDCl₃: $\delta = 7.26$). Die Auswertung erfolgte nach erster Ordnung mit *Mestre-C* als Software. Bedeutung der Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplett, sh = Signalhaufen, bs = breites Singulett, sowie Kombinationen davon wie z. B. ddt = Dublett von Dublett von Triplet. Die chemischen Verschiebungen sind δ -Werte und werden in ppm angegeben.

¹³C-NMR-Spektren wurden ebenfalls mit oben genanntem 400 MHz-Kernresonanzspektrometern aufgenommen (Messfrequenz 100 MHz). Die Kalibrierung erfolgte in Bezug auf das Lösungsmittelsignal (CDCl₃: 77.0 ppm). Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben. Die Messungen erfolgten breitbandentkoppelt, so dass die theoretischen Kopplungen angegeben sind. Bedeutung der Abkürzungen: s = Singulett (quartäres C-Atom), d = Dublett (CH-Gruppe), t = Triplet (CH₂-Gruppe), q = Quartett (CH₃-Gruppe). Zur korrekten Zuordnung der ¹H- und ¹³C-Signale wurden 2-dimensionale Messmethoden wie **H,H-COSY** und **HSQC** zu Hilfe genommen. Die 2D-Spektren wurden mit *Mestre-C* als Software ausgewertet.

Schmelzpunkte wurden unkorrigiert in offenen Glaskapillaren mittels einer MEL-TEMP-Schmelzpunktbestimmungsapparatur der Firma *Laboratory Devices* gemessen.

Absorptions, Anregungs- und Emissionspektren wurden an der Universität des Saarlandes im Arbeitskreis von Prof. G. Jung aufgenommen. Die Messungen wurden in Quarzküvetten mit 1 cm Durchmesser in spektroskopisch reinem DMSO gemessen. Die Absorptionsspektren wurden mit einem *V-650* Spektrometer der Firma *Jasco* aufgenommen, während die Anregungs- und Emissionsspektren mittels einem *FP-6500* Spektrofluorometer der Firma *Jasco* gemessen wurden.

Fluoreszenzquantenausbeuten wurden an der Universität des Saarlandes im Arbeitskreis von Prof. G. Jung von Frau Dagmar Auerbach über die Relativmethode bestimmt. Hierzu wurden die Lebenszeiten der Verbindungen gemessen und mit denen einer literaturbekannten Verbindung verglichen. Durch in Bezugsetzen der Lebenszeiten zur Referenzverbindung wurden dann Quantenausbeuten ermittelt.

Elementaranalysen wurden am Institut für Organische Chemie der Universität des Saarlandes von Frau Heike Roeser und Frau Susanne Harling (Anorganische Festkörperchemie, UdS) an einem Gerät der Firma *Leco* (Modell *CHN900*) gemessen.

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden an der Universität des Saarlandes von Herrn Rudi Thomes an einem *MAT 95Q*-Gerät der Fa. *Finnigan* aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte durch chemische Ionisierung (CI).

Lösungsmittel wurden von dem zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes bezogen und vor Verwendung destilliert.

Wasserfreie Lösungsmittel wurden nach den üblichen Verfahren absolutiert (THF über Lithiumaluminiumhydrid, Diethylether und Toluol über Natrium, Dichlormethan über Calciumhydrid) und unter Schutzgasatmosphäre gelagert. Versuche mit wasserfreien Lösungsmitteln wurden grundsätzlich in zuvor am Hochvakuum ausgeheizten Glasgeräten unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Glycin-*tert*-butylester wurde durch Ammonolyse von Bromessigsäure-*tert*-butylester erhalten.^[175]

N-Allyl-TFA-glycin-*tert*-butylester und *C*-Allyl-TFA-glycin-*tert*-butylester wurden durch allylische Alkylierung von TFA-Glycin-*tert*-butylester hergestellt.^[71, 72]

AAV 1: Michael-Additionsreaktion^[18, 70]

In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurde eine 1.6 molare *n*-Butyllithium-Lösung (0.75 mmol, 2.50 Äq.) langsam zu einer Lösung von HMDS/LDA/TMP (0.94 mmol, 3.13 Äq.) in 1 ml abs. THF bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ getropft. Die farblose Basenlösung wurde nach Entfernen des Kältebades 10 min bei Raumtemperatur gerührt. In einem zweiten Schlenkrohr wurden 0.33 mmol (1.10 Äq.) des in der Reaktion eingesetzten Metallsalzes und 0.33 mmol (1.10 Äq.) des TFA-Glycin-*tert*-butylesterderivates in 1 ml abs. THF gelöst. Die frisch bereitete Basenlösung wurde erneut auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und anschließend die Glycinester-Metallsalzlösung des zweiten Rohres zugetropft. Nach 30 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden vorsichtig 0.30 mmol (1.00 Äq.) des entsprechenden Nitroalkens in 0.30 ml abs. THF zugespritzt. Die Reaktionslösung wurde dann zwei Stunden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Nach Reaktionskontrolle wurde mit Essigsäureethylester verdünnt und mit 1 M Kaliumhydrogensulfatlösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Hex:EE).

AAV 2: *in situ* 1,3-dipolare Cycloaddition^[16, 57, 67, 69, 70]

Durch *in situ* Umsetzung des Michael-Produktes mit Cyanurchlorid wurde das entsprechende Isoxazolin erhalten. Hierzu wurden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 166 mg (0.90 mmol, 3.00 Äq.) Cyanurchlorid in 0.5 ml abs. THF portionsweise über 15 min zu der Reaktionslösung aus **AAV 1** gegeben. Nach dreistündigem Rühren bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der Ansatz analog **AAV 1** mit Essigsäureethylester verdünnt und mit Kaliumhydrogensulfatlösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Hex:EE).

AAV 3: Synthese von β -Ketoestern^[129]

Eine Suspension aus Magnesiumchlorid (15.6 mmol, 1.04 Äq.) und Methylkaliummalonat (22.5 mmol, 1.50 Äq.) in 22 ml abs. THF wurde bei 50 °C vier Stunden unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Währenddessen wurden in einem weiteren Schlenkkolben 1,1'-Carbonyldiimidazol (18.0 mmol, 1.20 Äq.) portionsweise zu einer Lösung der entsprechenden Säure (1.00 Äq.) in 2 ml/mmol abs. THF bei 5 °C gegeben und das Gemisch eine Stunde bei RT gerührt. Die Imidazolid-Lösung des zweiten Kolbens wurde bei RT zu der Methylmagnesiummalonatlösung gegeben und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester suspendiert. Die Suspension wurde anschließend mit 1 M KHSO₄-Lösung, ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer abdestilliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE bzw. PE:EE) wurde der entsprechende β -Ketoester erhalten.

AAV 4: Titan-katalysierte Pechmann-Cumarin-Synthese

8-Hydroxyjulodin **12** (1.00 mmol, 1.00 Äq.) und 1.00 Äq. des entsprechenden β -Ketoesters wurden in 3 ml/mmol abs. Toluol suspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe einer 1 M Chlortri-*iso*-propoxytitan-Lösung (in Hexan, 2.00 mmol, 2.00 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch mit Dichlormethan verdünnt, in eine ges. Na-/K-Tatrat-Lösung gegossen und bis zur Phasentrennung gerührt. Die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde in wenig Ethanol aufgenommen, mit Hexan überschichtet und im Kühlschrank gelagert. Zur Reinigung wurde der so ausgefallene Feststoff aus Ethanol/Hexan umkristallisiert. Als Produkt wurde ein gelber Feststoff erhalten. Alternativ erfolgte die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie.

AAV 5: Spaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch kat. Hydrierung

Ein Äquivalent des *N*-Benzyloxycarbonyl geschützten Fluoreszenz-*Label* wurde in Methanol gelöst, mit 10 Gew.-% eines Palladium-Katalysators auf Aktivkohle (10 Gew.-%) versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bis zum vollständigen Umsatz gerührt (DC-Kontrolle). Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt.

AAV 6: Kupfer-katalysierte Azid-Acetylen-Click-Chemie^[176]

Zu einer Lösung des Azids (0.34 mmol, 1.00 Äq.) in 4 ml DMSO wurde unter Rühren das Alkin (0.51 mmol, 1.50 Äq.) und 1 ml dest. Wasser zugegeben. Anschließend wurden 34 µl (10 mol-%) einer wässrigen 1 M Natriumascorbat-Lösung gefolgt von 34 µl (10 mol-%) einer wässrigen 1 M Kupfer(II)sulfat-Lösung zur Mischung gespritzt und unter kräftigem Rühren über Nacht auf 80 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt.

AAV 7: Wong-Methode zur Gewinnung von Aziden aus primären Aminen^[155]

Zuerst wurde eine Triflylazid-Lösung frisch hergestellt. Hierzu wurde Natriumazid (9.80 mmol, 9.80 Äq.) in 1.6 ml dest. Wasser und 2.6 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, langsam über 5 min mit Triflyanhydrid (1.99 mmol, 1.99 Äq.) versetzt und 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase zweimal mit 2 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. Na₂CO₃-Lösung gewaschen und ohne weitere Aufreinigung zum Diazotransfer eingesetzt. Die Aminosäure/das Peptid (1.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit Kaliumcarbonat (1.50 mmol, 1.50 Äq.) und Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (10 µl einer 1 M Lösung, 1 mol-%) in 3 ml dest. Wasser und 6 ml Methanol gelöst. Zu dieser Mischung wurde die zuvor bereitete Triflylazid-Lösung gegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, der Rückstand dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Azid wurde ohne weitere Reinigung in den darauffolgenden Reaktionen eingesetzt.

AAV 8: Synthese von Allylethylcarbonaten^[77]

Zu einer Lösung des Allylalkohols (1.00 Äq.) in trockenem Pyridin (1ml/mmol) wurden bei 0 °C Chlorameisensäureethylester (2.00 Äq.) getropft und die Reaktionsmischung über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Verdünnen mit Dichlormethan wurde die organische Phase mit 1 M Kupfer(II)sulfat-Lösung gewaschen bis überschüssiges Pyridin vollständig entfernt war und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 9: Palladium-katalysierte allylische Substitutionsreaktion^[77]

In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurde unter Schutzgasatmosphäre zuerst das Zink-Enolat hergestellt. Hierzu wurde HMDS (0.69 mmol, 2.75 Äq.) in abs. THF (1 ml) gelöst. Nach Abkühlung auf -78 °C wurde eine 1.6 M *n*-Butyllithiumlösung (0.63 mmol, 2.50 Äq.) langsam zugetropft, das Kältebad wurde entfernt und die farblose Lösung 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die frisch bereitete Basenlösung auf -78 °C

gekühlt. In einem zweiten Schlenkrohr wurde Zinkchlorid (0.28 mmol, 1.10 Äq.) ausgeheizt, eine Lösung des geschützten Aminosäurederivat (57 mg, 0.25 mmol, 1.00 Äq.) in abs. THF (1 ml) zugegeben und diese Lösung zur Basenlösung zugetropft. Vor Zugabe der Katalysator-/Substratlösung wurde zur vollständigen Transmetallierung noch ca. 30 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt.

Während der Transmetallierung wurde die Katalysator-/Substratlösung zubereitet. In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurden unter Schutzgas Allylpalladiumchlorid-Dimer (1 mol-%, $2.50\text{ }\mu\text{mol}$) und Triphenylphosphin (4.5 mol-%, $11.3\text{ }\mu\text{mol}$) in abs. THF (0.5 ml) gelöst. Die gelbe Lösung wurde kurz bei Raumtemperatur gerührt und dann mit dem entsprechenden Allylsubstrates (0.30 mmol, 1.10 Äq.) versetzt.

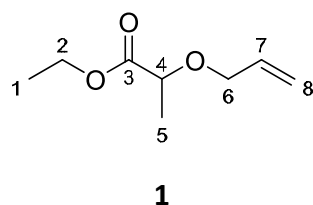
Im Anschluss wurde die Katalysator-/Substratlösung zu der $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalten Zinkenolat-suspension gegeben. Über Nacht ließ man die klare gelbe Lösung unter Rühren im Kältebad auf Raumtemperatur erwärmen. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit 1 M KHSO_4 -Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, PE:EE) gereinigt.

7.3 Synthese der Verbindungen

2-Allyloxy-propansäureethylester (1)

1.57 g (39.0 mmol, 1.30 Äq.) 60 %-iges Natriumhydrid in Paraffinöl wurden in 42 ml abs. DMF suspendiert und es wurden langsam 5.54 g (30.0 mmol, 1.00 Äq.) Milchsäureethylester zugespritzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 min bei RT gerührt, anschließend vorsichtig mit 3.9 ml (5.44 g, 45.0 mmol, 1.50 Äq.) Allylbromid versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Reaktionskontrolle wurde das DMF am Rotationsverdampfer entfernt und der resultierende Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen. Die organische Lösung des Rückstandes wurde mit dest. Wasser sowie ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Reinigung des am Rotationsverdampfer eingeengten Rohproduktes erfolgte destillativ (6 mbar, $48\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das Produkt **1** wurde als farbloses Öl erhalten (2.85 g, 18.0 mmol, 60 % d. Th.).

$R_f(\mathbf{1}) = 0.47$ (Hex:EE 8:2)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.29 (t, $^3J_{1,2}$ = 7.1 Hz, 3 H, 1-H), 1.41 (d, $^3J_{5,4}$ = 6.8 Hz, 3 H, 5-H), 3.94 (m, 1 H, 6-H), 4.00 (q, $^3J_{4,5}$ = 6.8 Hz, 1 H, 4-H), 4.12 (m, 1 H, 6'-H), 4.21 (m, 2 H, 2-H), 5.19 (ddt, $^3J_{8trans,7}$ = 10.4 Hz, $^2J_{8trans,8cis}$ = $^4J_{8trans,6}$ = 1.6 Hz, 1 H, 8-H_{trans}), 5.29 (ddt, $^3J_{8cis,7}$ = 17.3 Hz, $^2J_{8cis,8trans}$ = $^4J_{8cis,6}$ = 1.6 Hz, 1 H, 8-H_{cis}), 5.92 (m, 1 H, 7-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 14.2 (q, C-1), 18.6 (q, C-5), 60.8 (t, C-2), 71.0 (t, C-6), 74.0 (d, C-4), 117.7 (t, C-8), 134.1 (d, C-7), 173.3 (s, C-3).

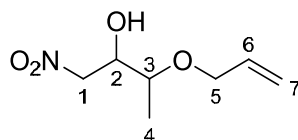
3-(Allyloxy)-1-nitro-butan-2-ol (2)DIBALH Reduktion^[177]

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.08 g (6.81 mmol, 1.00 Äq.) des *O*-Allyl-Milchsäureethylesters in 14 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurden 7.5 ml (7.49 mmol, 1.10 Äq.) einer 1 M DIBALH-Lösung langsam zugetropft und zwei Stunden bei -78 °C gerührt. Nach Reaktionskontrolle wurde das Reaktionsgemisch in eine Lösung aus 6.12 g K-/Na-Tatrat in 33 ml Eiswasser und 14 ml Dichlormethan gegossen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten Ether- und Dichlormethanphasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Der erhaltene Rohaldehyd wurde direkt in eine Henry-Reaktion eingesetzt.

Henry-Nitroaldolreaktion

Der Rohaldehyd wurde in 15 ml abs. Isopropanol und 2 ml abs. Benzol gelöst. 1.8 ml (2.07 g, 34.0 mmol, 5.00 Äq.) Nitromethan und 67 mg (1.16 mmol, 0.17 Äq.) Kaliumfluorid wurden zur Aldehydlösung gegeben und diese über Nacht bei RT gerührt. Nach Reaktionskontrolle wurde der mit 17 ml Dichlormethan verdünnte Ansatz über Celite filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen, mit NaCl-Lösung gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und erneut das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 9:1) gingen 1.05 g (5.99 mmol, 88 % d. Th.) des Produktes **2** als gelbes Öl aus der Reaktion hervor.

R_f(2) = 0.17 (Hex:EE 8:2)

**2**

Hauptdiastereomer:**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.22 (d, $^3J_{4,3}$ = 6.3 Hz, 3 H, 4-H), 2.74 (bs, 1 H, OH), 3.57 (m, 1 H, 3-H), 3.92 (m, 1 H, 5-H), 4.12 (m, 1 H, 5'-H), 4.23 (m, 1 H, 2-H), 4.50 (dd, $^2J_{1,1'}$ = 19.7 Hz, $^3J_{1,2}$ = 9.6 Hz, 1 H, 1-H), 4.60 (dd, $^2J_{1',1}$ = 13.2 Hz, $^3J_{1',2}$ = 2.8 Hz, 1 H, 1'-H), 5.20 (ddt, $^3J_{7trans,6}$ = 10.3 Hz, $^2J_{7trans,7cis}$ = $^4J_{7trans,5}$ = 1.3 Hz, 1H, 7-H_{trans}), 5.27 (ddt, $^3J_{7cis,6}$ = 17.3 Hz, $^2J_{7cis,7trans}$ = $^4J_{7cis,5}$ = 1.3 Hz, 1 H, 7-H_{cis}), 5.87 (m, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 15.5 (q, C-4), 69.9 (t, C-5), 71.6 (d, C-2), 75.2 (d, C-3), 77.6 (t, C-1), 117.5 (t, C-7), 134.2 (d, C-6).

Nebendiastereomer: (ausgewählte Signale):**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.41 (d, $^3J_{4,3}$ = 6.3 Hz, 3 H, 4-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 15.1 (q, C-4), 70.0 (t, C-5), 71.8 (d, C-2), 74.1 (d, C-3), 78.1 (t, C-1), 117.7 (t, C-7), 134.2 (d, C-6).

Elementaranalyse:

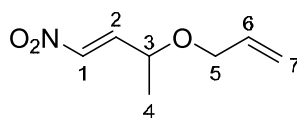
C ₇ H ₁₃ NO ₄	Ber.	C 47.99	H 7.48	N 8.00
(175.18)	Gef.	C 47.98	H 7.41	N 7.60

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₇ H ₁₃ NO ₄ [M] ⁺	175.0845	175.0857

3-(Allyloxy)-1-nitrobut-1-en (3)

Zu einer Lösung des Nitroaldolproduktes **2** (2.14 g, 12.2 mmol, 1.00 Äq.) in 120 ml abs. Dichlormethan wurden bei -78 °C 1.1 ml (1.67 g, 14.6 mmol, 1.20 Äq.) Methansulfonylchlorid zugespritzt. Nach 10 min Rühren wurden tropfenweise 5.2 ml (30.5 mmol, 2.50 Äq.) DIPEA zugegeben und über Nacht auf RT kommen gelassen. Die Reaktionslösung wurde mit dest. Wasser, 2 M HCl sowie ges. NH₄Cl-Lösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das am Rotationsverdampfer eingeeengte Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, Hex:EE 9:1) gereinigt. 1.08 g (6.86 mmol, 58 % d. Th.) eines gelben Öls wurden als Produkt **3** isoliert.

R_f(3) = 0.50 (Hex:EE 8:2)

**3**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.36 (d, $^3J_{4,3}$ = 6.6 Hz, 3 H, 4-H), 4.01 (d, $^3J_{5,6}$ = 5.6 Hz, 2 H, 5-H), 4.23 (m, 1 H, 3-H), 5.21 (ddt, $^3J_{7trans,6}$ = 10.4 Hz, $^2J_{7trans,7cis}$ = $^4J_{7trans,5}$ = 1.5 Hz, 1 H, 7-H_{trans}), 5.29 (ddt, $^3J_{7cis,6}$ = 17.3 Hz, $^2J_{7cis,7trans}$ = $^4J_{7cis,5}$ = 1.5 Hz, 1 H, 7-H_{cis}), 5.88 (m, 1 H, 6-H), 7.10–7.20 (sh, 2 H, 1-H, 2-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.1 (q, C-4), 70.1 (t, C-5), 71.0 (d, C-3), 117.5 (t, C-7), 134.0 (d, C-6), 139.4 (d, C-1), 143.0 (d, C-2).

Elementaranalyse:

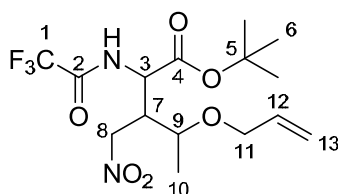
C ₇ H ₁₁ NO ₃	Ber.	C 53.49	H 7.05	N 8.91
(157.17)	Gef.	C 53.19	H 6.78	N 8.64

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₇ H ₁₁ NO ₃ [M] ⁺	157.0739	157.0748

4-(Allyloxy)-3-(nitromethyl)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)-pentansäure-*tert*-butylester (4)

Gemäß **AAV1** wurden 75 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) des *N*-Trifluoroacetyl-glycin-*tert*-butylesters mit 47 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des Nitroalkens **3** in Gegenwart von 45 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) ZnCl₂ umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 95:5, 9:1) wurden 108 mg (0.28 mmol, 94 % d. Th.) eines Diastereomeren-gemisches als leicht gelbliches Öl **4** erhalten.

R_f(4) = 0.13 (Hex:EE 9:1)

**4****Hauptdiastereomere (85 %):****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.25 (d, $^3J_{10,9}$ = 6.3 Hz, 3 H, 10-H), 1.48 (s, 9 H, 6-H), 2.91 und 3.05 (m, 1 H, 7-H), 3.70 (m, 1 H, 8-H), 3.83 (ddt, $^2J_{11,11'}$ = 12.5 Hz, $^3J_{11,12}$ = 6.4 Hz, $^4J_{11,13}$ = 1.2 Hz, 1 H, 11-H), 4.01 und 4.10 (ddt, $^2J_{11',11}$ = 12.5 Hz, $^3J_{11',12}$ = 6.4 Hz, $^4J_{11',13}$ = 1.2 Hz, 1 H, 11'-H), 4.59–4.67 (sh, 3 H, 8'-H, 3-H, 9-H), 5.21 (m, 2 H, 13-H), 5.83 (m, 1 H, 12-H), 7.32 und 7.69 (bs, 1 H, NH).

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

δ = 16.9 und 17.0 (q, C-10), 27.9 und 28.0 (q, C-6), 44.4 und 44.7 (d, C-3/ C-7), 53.4 und 54.6 (d, C-3/C-7), 69.7 und 70.1 (t, C-8), 72.4 (d, C-9/t, C-11), 72.5 (d, C-9/t, C-11), 84.1 und 84.7 (s, C-5), C-1 nicht sichtbar, 118.0 und 119.1 (t, C-13), 133.3 und 133.8 (d, C-12), C-2 nicht sichtbar, 167.5 und 167.9 (s, C-4).

Nebendiastereomere (15 %, ausgewählte Signale):

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

δ = 3.24 (m, 1 H, 9-H), 7.87 (bs, 1 H, NH).

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

δ = 16.8 (q, C-10), 27.8 (q, C-6), 42.8 (d, C-3/C-7), 52.9 (d, C-3/C-7), 69.6 (t, C-8), 83.8 (s, C-5), 117.9 (t, C-13), 132.9 (d, C-12), 167.4 (s, C-4).

Elementaranalyse:

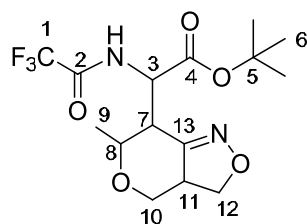
$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$	Ber.	C 46.87	H 6.03	N 7.29
(384.35)	Gef.	C 46.96	H 6.05	N 7.47

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$ [M+H] ⁺	385.1586	385.1563

***tert*-Butyl-2-(6-methyl-3a,4,6,7-tetrahydro-3-*H*-pyrano[4,3-*c*]isoxazol-7-yl)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetat (5)**

Gemäß **AAV1** wurden 75 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) des *N*-Trifluoeracetyl-glycin-*tert*-butyl-ester unter Verwendung von 45 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) ZnCl_2 als Metallsalz mit 47.2 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des Nitroalkens **3** umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden bei -78°C wurde das Michael-Produkt analog **AAV2** *in situ* mit Cyanurchlorid zur Reaktion gebracht. Hierzu wurden bei -78°C zu dem Additionsprodukt 166 mg (0.90 mmol, 3.00 Äq.) TCT innerhalb von 15 min gegeben, drei Stunden bei -78°C gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das erhaltene gelbe Reaktionsgemisch wurde mit Essigsäureethylester verdünnt und mit 1 M KHSO_4 -Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert, anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE 9:1, 8:2) des Rückstandes gingen aus der Reaktion 103 mg (0.28 mmol, 94 % d. Th.) eines Diastereomereingemisches eines farblosen, kristallinen Feststoffes **5** hervor.

$R_f(5)$ = 0.43 (Hex:EE 8:2)



5

Hauptdiastereomere (77 %):**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.25–1.53 (sh, 12 H, 6-H, 9-H), 3.10 (dd, $^3J_{7,8}$ = 10.0 Hz, $^3J_{7,3}$ = 2.9 Hz, 1 H, 7-H), 3.21–4.07 (sh, 5 H, 10-H, 11-H, 12-H), 4.40 (m, 1 H, 8-H), 4.69 und 4.93 (dd, $^3J_{3,NH}$ = 9.7 Hz, $^3J_{3,7}$ = 2.9 Hz, 1 H, 3-H), 7.29 und 7.64 (d, $^3J_{NH,3}$ = 9.7 Hz, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 17.7 und 19.4 (q, C-9), 27.7 und 27.8 (q, C-6), 46.0 (d, C-7), 48.2 (d, C-11), 50.5 (d, C-3), 69.7 (d, C-8), 71.5 (t, C-12), 76.2 (t, C-10), 83.8 und 84.0 (s, C-5), C-1 nicht sichtbar, 152.9 (s, C-13), C-2 nicht sichtbar, 167.1 und 168.0 (s, C-4).

Nebendiastereomere (23 %, ausgewählte Signale):**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 2.94 (dd, $^3J_{7,8}$ = 10.0 Hz, $^3J_{7,3}$ = 2.9 Hz, 1 H, 7-H), 4.87 (dd, $^3J_{3,NH}$ = 9.7 Hz, $^3J_{3,7}$ = 2.9 Hz, 1 H, 3-H), 7.01 (d, $^3J_{NH,3}$ = 9.7 Hz, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 17.4 (q, C-9), 27.9 (q, C-6), 84.5 (s, C-5), 167.3 (s, C-4).

Elementaranalyse:

C ₁₅ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₅	Ber.	C 49.18	H 5.78	N 7.65
(366.14)	Gef.	C 49.16	H 5.78	N 7.80

HRMS (CI):

	Berechnet	Gefunden
C ₁₅ H ₂₂ F ₃ N ₂ O ₅ [M+H] ⁺	367.1481	367.1510

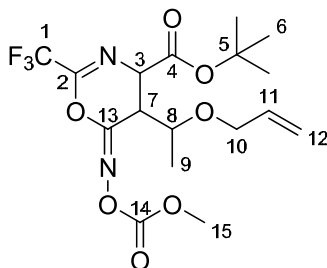
Schmelzpunkt: 94–98 °C

6-Methoxycarbonyloxyimino-5-(ethyl(1-allyloxy))-2-trifluormethyl-5,6-di-hydro-4H-1,3-oxazin-4-carbonsäure-*tert*-butylester (6)

Gemäß **AAV1** wurden 75 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) des *N*-Trifluoracetyl-glycin-*tert*-butylesters unter Verwendung von 45 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) ZnCl₂ als Metallsalz mit 47 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des Nitroalkens **3** umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden bei –78 °C wurde das Michael-Produkt analog **AAV2** *in situ* mit Chlorameisensäuremethylester zur Reaktion gebracht. Hierzu wurden bei –78 °C zu dem Additionsprodukt 85 mg (0.90 mmol, 3.00 Äq.) Chlorameisensäuremethylester innerhalb von 15 min zugespritzt, über Nacht auf RT erwärmen gelassen und die Reaktion dünnschichtchromato-

graphisch verfolgt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Essigsäureethylester verdünnt und mit 1 M KHSO_4 -Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und anschließend die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE 9:1) des Rückstandes gingen aus der Reaktion 49 mg (0.12 mmol, 40 % d. Th.) eines Diastereomerengemisches **6** als farbloses Öl hervor.

$R_f(\mathbf{6}) = 0.25$ (Hex:EE 8:2)



6

Hauptdiastereomere (89 %):

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

$\delta = 1.27$ und 1.30 (d, $^3J_{9,8} = 6.2$ Hz, 3 H, 9-H), 1.45 und 1.49 (s, 9 H, 6-H), 3.03 und 3.05 (dd, $^3J_{7,8} = 6.7$ Hz, $^3J_{7,3} = 1.2$ Hz, 1 H, 7-H), 3.79 – 3.88 (sh, 2 H, 8-H, 10-H), 3.93 (s, 3-H, 15-H), 4.05 (m, 1 H, 10'-H), 4.57 und 4.84 (s, 1H, 3-H), 5.22 (m, 2 H, 11-H), 5.82 (m, 1 H, 12-H).

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

$\delta = 17.3$ und 17.5 (q, C-9), 27.7 (q, C-6), 40.1 und 41.4 (d, C-7), 55.6 und 55.7 (q, C-15), 56.7 und 60.2 (d, C-3), 70.3 und 70.4 (d, C-8), 73.7 und 76.2 (t, C-10), 84.0 (s, C-5), C-1 nicht sichtbar, 117.9 und 118.0 (t, C-12), 133.7 und 133.8 (d, C-11), C-2 nicht sichtbar, 149.4 und 151.1 (s, C-13), 153.5 und 153.6 (s, C-14), 166.4 und 166.6 (s, C-4).

Nebendiastereomere (11 %, ausgewählte Signale):

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

$\delta = 1.23$ (d, $^3J_{9,8} = 6.2$ Hz, 3 H, 9-H), 1.49 und 1.52 (s, 9 H, 6-H), 2.82 und 2.88 (dd, $^3J_{7,8} = 6.7$ Hz, $^3J_{7,3} = 1.2$ Hz, 1 H, 7-H), 3.95 (s, 3-H, 15-H), 4.51 (s, 1H, 3-H).

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

$\delta = 27.9$ und 28.0 (q, C-6), 43.4 (d, C-7), 52.5 (d, C-8), 54.7 (q, C-15), 56.0 (d, C-3), 69.4 und 71.5 (d, C-8), 73.3 (t, C-10), 82.2 und 83.8 (s, C-5), 117.2 (t, C-12).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7$	Ber.	C 48.11	H 5.46	N 6.60
(410.34)	Gef.	C 48.45	H 5.95	N 6.78

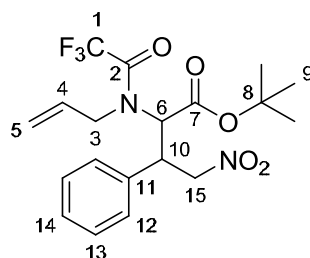
HRMS (CI):

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	Berechnet	Gefunden
	425.1536	425.152

2-(*N*-Allyl-2,2,2-trifluoracetamido)-4-nitro-3-phenylbutansäure-*tert*-butylester (7)

Gemäß **AAV1** wurden 88 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) des *N*-Allyl-TFA-glycin-*tert*-butylesters mit 45 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) β -Nitrostyrol in Gegenwart von 45 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) ZnCl_2 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 95:5, 9:1) wurden 83 mg (0.20 mmol, 65 % d. Th.) eines Diastereomereingemisches als leicht gelbliches Öl **7** erhalten.

$R_f(\mathbf{7}) = 0.15$ (Hex:EE 9:1)



7

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

$\delta = 1.46$ (s, 9 H, 9-H), 3.09 (dd, $^2J_{3,3'} = 16.0$ Hz, $^3J_{3,4} = 8.2$ Hz, 1 H, 3-H), 3.88 (dd, $^2J_{3',3} = 16.0$ Hz, $^3J_{3',4} = 8.2$ Hz, 1 H, 3'-H), 4.01 (d, $^3J_{6,10} = 10.4$ Hz, 1 H, 6-H), 4.51 (dt, $^3J_{10,6} = 10.4$ Hz, $^3J_{10,15} = 4.3$ Hz, 1 H, 10-H), 4.92 (dd, $^2J_{15,15'} = 13.2$ Hz, $^3J_{15,10} = 9.9$ Hz, 1 H, 15-H), 5.19–5.36 (sh, 3 H, 15'-H, 5-H), 5.61 (m, 1 H, 4-H), 7.16–7.35 (sh, 5 H, 12-H, 13-H, 14-H).

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

$\delta = 27.8$ (q, C-9), 42.7 (d, C-10), 52.7 (t, C-3), 61.7 (d, C-6), 77.8 (t, C-15), 83.7 (s, C-8), C-1 nicht sichtbar, 120.7 (t, C-5), 128.1 (d, C-12/C-13/C-14), 128.6 (d, C-12/C-13/C-14), 129.0 (d, C-12/C-13/C-14), 131.7 (d, C-4), 135.8 (s, C-11), C-2 nicht sichtbar, 166.9 (s, C-7).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	Ber. C 54.80	H 5.57	N 6.73
(416.39)	Gef. C 55.13	H 5.58	N 7.11

HRMS (CI):

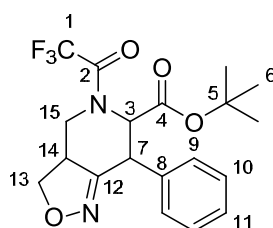
	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$ [M- <i>t</i> Bu+H] ⁺	361.1011	361.1025

7-Phenyl-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-3,3a,4,5,6,7-hexahydroisoxazolo-[4,3-c]pyridin-6-carbonsäure-*tert*-butylester(8)

Gemäß **AAV1** wurden 88 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) des *N*-Allyl-TFA-glycin-*tert*-butylesters unter Verwendung von 45 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) ZnCl_2 als Metallsalz mit 45 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des β -Nitrostyrols umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden bei -78 °C wurde das Michael-Produkt analog **AAV2** *in situ* mit Cyanurchlorid zur Reaktion gebracht. Hierzu wurden bei -78 °C 166 mg (0.90 mmol, 3.00 Äq.) TCT innerhalb

von 15 min gegeben, drei Stunden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das erhaltene gelbe Reaktionsgemisch wurde mit Essigsäureethylester verdünnt und mit 1 M Kaliumhydrogensulfat-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und anschließend die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE 9:1, 8:2) des Rückstandes gingen aus der Reaktion 55 mg (0.14 mmol, 48 % d. Th.) eines Diastereomeren- und Rotamerengemisches **8** als farbloser, kristalliner Feststoff hervor.

$R_f(\mathbf{8}) = 0.47$ (Hex:EE 8:2)



8

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

$\delta = 1.22$ (s, 9 H, 6-H), 3.46 (m, 1 H, 14-H), 3.57–5.03 (sh, 5 H, 7-H, 13-H, 15-H), 5.51 (d, $^3J_{3,7} = 6.4$ Hz, 1 H, 3-H), 7.30–7.56 (sh, 5 H, 9-H, 10-H, 11-H).

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

$\delta = 27.9$ (q, C-6), 40.8 (t, C-15), 43.6 (d, C-7), 47.8 (q, C-14), 57.1 (d, C-3), 71.0 (t, C-13), 84.4 (s, C-5), 117.6 (s, C-1), 126.5 (d, C-9/C-10/C-11), 127.9 (d, C-9/C-10/C-11), 129.3 (d, C-9/C-10/C-11), 135.4 (s, C-8), 155.7 (s, C-2), 157.3 (s, C-12), 166.5 (s, C-4).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$	Ber.	C 57.28	H 5.31	N 7.03
(398.15)	Gef.	C 57.49	H 5.59	N 6.69

HRMS (CI): Berechnet Gefunden

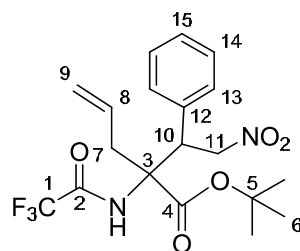
$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 399.1532 399.1504

Schmelzpunkt: 108–109 $^{\circ}\text{C}$

2-(2-Nitro-1-phenylethyl)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)-pent-4-ensäure-*tert*-butylester (**9**)

Gemäß **AAV1** wurden 88 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) des α -Allyl-TFA-glycin-*tert*-butylesters mit 45 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des β -Nitrostyrols in Gegenwart von 45 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) ZnCl_2 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 95:5, 9:1) wurden 101 mg (0.29 mmol, 95 % d. Th.) eines Diastereomereengemisches als leicht gelbliches Öl **9** erhalten.

$R_f(9) = 0.10$ (Hex:EE 9:1)



9

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

$\delta = 1.60$ (s, 9 H, 6-H), 2.75 (dd, $^2J_{7,7'} = 13.7$ Hz, $^3J_{7,8} = 6.8$ Hz, 1 H, 7-H), 3.42 (dd, $^2J_{7',7} = 13.7$ Hz, $^3J_{7',8} = 6.8$ Hz, 1 H, 7'-H), 4.68 (dd, $^3J_{10,11} = 9.8$ Hz, $^3J_{10,11} = 5.4$ Hz, 1 H, 10-H), 5.04–5.23 (sh, 4 H, 9-H, 11-H), 5.48 (m, 1 H, 8-H), 7.01 (bs, 1H, NH), 7.11–7.34 (sh, 5 H, 13-H, 14-H, 15-H).

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

$\delta = 28.0$ (q, C-6), 37.8 (t, C-7), 47.0 (d, C-10), 66.4 (s, C-3), 76.6 (t, C-11), 86.2 (s, C-5), C-1 nicht sichtbar, 121.8 (t, C-9), 128.9 (d, C-13/C-14/C-15), 128.9 (d, C-13/C-14/C-15), 129.0 (d, C-13/C-14/C-15), 129.5 (d, C-8), 134.4 (s, C-12), C-2 nicht sichtbar, 168.7 (s, C-4).

Elementaranalyse:

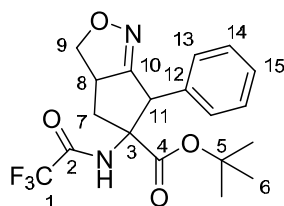
$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$	Ber.	C 54.80	H 5.57	N 6.73
(416.39)	Gef.	C 55.04	H 5.46	N 6.73

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	417.1638	417.1606

6-Phenyl-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)-3a,4,5,6-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]isoxazol-5-carbonsäure-*tert*-butylester (10)

Gemäß **AAV1** wurden 88 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) des α -Allyl-TFA-glycin-*tert*-butylesters unter Verwendung von 45 mg (0.33 mmol, 1.10 Äq.) ZnCl_2 als Metallsalz mit 45 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des β -Nitrostyrols umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden bei -78 °C wurde das Michael-Produkt analog **AAV2** *in situ* mit Cyanurchlorid zur Reaktion gebracht. Hierzu wurden bei -78 °C 166 mg (0.90 mmol, 3.00 Äq.) TCT innerhalb von 15 min gegeben, drei Stunden bei -78 °C gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das erhaltene gelbe Reaktionsgemisch wurde mit Essigsäureethylester verdünnt und mit 1 M Kaliumhydrogensulfat-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE 9:1, 8:2) des Rückstandes gingen aus der Reaktion 91 mg (0.23 mmol, 76 % d. Th.) eines Diastereomergemisches **10** als farbloser Feststoff hervor.

$R_f(\mathbf{10}) = 0.45$ (Hex:EE 8:2)



10

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

$\delta = 1.30$ (s, 9 H, 6-H), 2.20 (dd, $^2J_{7,7'} = 14.0$ Hz, $^3J_{7,8} = 7.3$ Hz, 1 H, 7-H), 2.77 (dd, $^2J_{7',7} = 14.0$ Hz, $^3J_{7',8} = 11.1$ Hz, 1 H, 7'-H), 3.94 (dd, $^3J_{9,8} = 13.0$ Hz, $^3J_{9,9'} = 7.8$ Hz, 1 H, 9-H), 4.49 (m, 1 H, 8-H), 4.71 (dd, $^3J_{9',8} = 10.1$ Hz, $^2J_{9',9} = 7.8$ Hz, 1 H, 9'-H), 5.06 (s, 1 H, 11-H), 7.16–7.54 (sh, 5 H, 13-H, 14-H, 15-H), 7.92 (bs, 1 H, NH).

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

$\delta = 27.6$ (q, C-6), 36.0 (t, C-7), 45.9 (d, C-11), 51.3 (d, C-8), 72.3 (s, C-3), 75.3 (t, C-9), 85.7 (s, C-5), C-1 nicht sichtbar, 128.4 (d, C-13/C-14/C-15), 128.5 (d, C-13/C-14/C-15), 129.1 (d, C-13/C-14/C-15), 131.8 (s, C-12), C-2 nicht sichtbar, 166.5 (s, C-10), 169.7 (s, C-4).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$	Ber.	C 57.28	H 5.31	N 7.03
(398.15)	Gef.	C 57.22	H 5.52	N 7.05

HRMS (CI):

$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$ [M-tBu] $^+$	Berechnet	Gefunden
	342.0827	342.0797

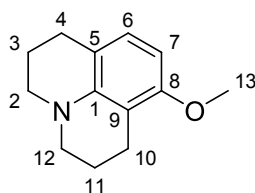
Schmelzpunkt: 97–101 °C

8-Methoxyjulodin (**11**)^[127]

Auf einen 500 ml-Dreihalskolben mit Innenthermometer wurde ein mit Molekularsieb (4 Å, 10 g) befüllter Tropftrichter gesetzt. Auf diesen Tropftrichter wurde ein Rückflusskühler aufgesetzt. Unter Stickstoffatmosphäre wurden anschließend 11.0 ml (12.3 g, 0.10 mol, 1.00 Äq.) 3-Methoxy-anilin, 160 ml (235 g, 1.50 mol, 15.0 Äq.) 1-Brom-3-chlorpropan und 42.7 g (0.40 mol, 4.00 Äq.) Natriumcarbonat im Kolben vereinigt. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde auf 70 °C, zwei Stunden auf 100 °C und schließlich 13 Stunden (ü.N.) unter Rückfluss erhitzt. Zu dem auf RT abgekühlten Gemisch wurden langsam 150 ml konz. HCl und 50 ml dest. H_2O zugegeben, wobei sich der Feststoff weitgehend löste. Nach Trennen der Phasen wurde die organische Phase mit 10%-iger HCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit der vorherigen wässrigen Phase vereint und dreimal mit Diethylether extrahiert. Mit Hilfe von ca. 300 ml 50 %-iger NaOH-Lösung wurde anschließend die wässrige Phase basisch gemacht und mit Diethylether extrahiert, bis die organische Phase farblos blieb. Nach Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erfolgte die destillative Aufreinigung (0.5–

1 mbar, 110–114 °C) des erhalten Rohproduktes. Letztendlich wurden 11.5 g (56.6 mmol, 57 % d. Th.) eines gelben Öls erhalten, das sich an der Luft rot färbte.

$R_f(\mathbf{11}) = 0.69$ (Hex:EE 8:2)



11

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

$\delta = 1.94\text{--}2.00$ (sh, 4 H, 3-H, 11-H), $2.66\text{--}2.74$ (sh, 4 H, 4-H, 10-H), $3.07\text{--}3.12$ (sh, 4 H, 2-H, 12-H), 3.77 (s, 3 H, 13-H), 6.17 (d, $^3J_{7,6} = 8.2$ Hz, 1 H, 7-H), 6.76 (d, $^3J_{6,7} = 8.2$ Hz, 1 H, 6-H).

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

$\delta = 21.1$ (t, C-11), 21.7 (t, C-3), 22.4 (t, C-10), 27.2 (t, C-4), 49.6 (t, C-2), 50.2 (t, C-12), 55.3 (q, C-13), 98.6 (d, C-7), 109.7 (s, C-9), 114.7 (s, C-5), 126.3 (d, C-6), 143.7 (s, C-1), 155.8 (s, C-8).

8-Hydroxyjulodin (12)

Etherspaltung mit HI^[127]

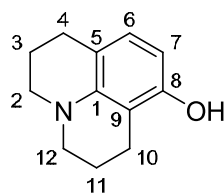
10.2 g (50.0 mmol, 1.00 Äq.) 8-Methoxyjulodin wurden in einem Gemisch aus 50 ml 47 %-iger HI, 80 ml konz. HCl und 200 ml dest. H_2O gelöst. Die Lösung wurde 18 h (ü.N.) unter Rückfluss erhitzt und dann erneut mit 50 ml konz. HCl versetzt. Nach weiteren 42 h Rückfluss (DC-Kontrolle) wurde die Reaktionslösung abgekühlt und mit 50 %-iger wässriger NaOH-Lösung (~100 ml) auf pH 6 gebracht. Unter Verwendung eines Phosphat-Puffers aus 6.90 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 1.40 g Na_2HPO_4 in 100 ml dest. H_2O wurde anschließend neutralisiert. Die neutrale, wässrige Phase wurde sechsmal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung und ges. Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, Hex:EE 8:2) gereinigt. Als Produkt **12** wurden 4.80 g (25.4 mmol, 51 % d. Th.) eines ockerfarbenen Feststoffes erhalten.

Etherspaltung mit BBr_3 ^[128]

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 0.78 g (3.00 mmol, 1.00 Äq.) 8-Methoxyjulodin **11** in 10 ml Dichlormethan wurden 0.75 g (3.00 mmol, 1.00 Äq.) Bortribromid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter einstündigem Rühren auf RT erwärmen gelassen. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt säulen-

chromatographisch (Kieselgel, Hex:EE 8:2) gereinigt. Als Produkt **12** wurden 301 mg (1.59 mmol, 53 % d. Th.) eines ockerfarbenen Feststoffes erhalten.

$R_f(\mathbf{12}) = 0.72$ (Hex:EE 1:1)



12

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

$\delta = 1.96\text{--}2.07$ (sh, 4 H, 3-H, 11-H), 2.63–2.72 (sh, 4 H, 4-H, 10-H), 3.08–3.12 (sh, 4 H, 2-H, 12-H), 4.55 (bs, 1 H, OH), 6.06 (d, $^3J_{7,6} = 8.0$ Hz, 1 H, 7-H), 6.70 (d, $^3J_{6,7} = 8.0$ Hz, 1 H, 6-H).

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

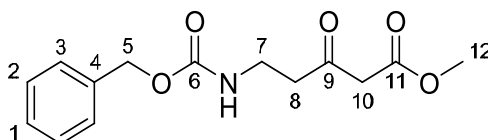
$\delta = 20.9$ (t, C-11), 21.6 (t, C-3), 22.4 (t, C-10), 27.2 (t, C-4), 49.5 (t, C-2), 50.2 (t, C-12), 102.9 (d, C-7), 107.8 (s, C-9), 114.3 (s, C-5), 126.7 (d, C-6), 143.9 (s, C-1), 151.7 (s, C-8).

Schmelzpunkt: 122–125 °C

5-(Benzyloxycarbonylamino)-3-oxo-pentansäuremethylester (**13**)^[129]

Gemäß **AAV 3** wurden 3.35 g (15.0 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Benzylcarbamat-geschütztem β -Alanin mit 2.92 g (18.0 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 3.51 g (22.5 mmol, 1.50 Äq.) Mono-Methylkaliummalonat, das mit 1.49 g (15.6 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 3:1→1:1) wurden 3.48 g (12.9 mmol, 83 % d. Th.) eines leicht gelben Öls **13** erhalten.

$R_f(\mathbf{13}) = 0.33$ (Hex:EE 1:1)



13

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

$\delta = 2.82$ (t, $^3J_{8,7} = 5.6$ Hz, 2 H, 8-H), 3.44–3.49 (sh, 4 H, 7-H, 10-H), 3.74 (s, 3 H, 12-H), 5.09 (s, 2 H, 5-H), 5.25 (bs, 1 H, NH), 7.32–7.37 (sh, 5 H, 1-H, 2-H, 3-H).

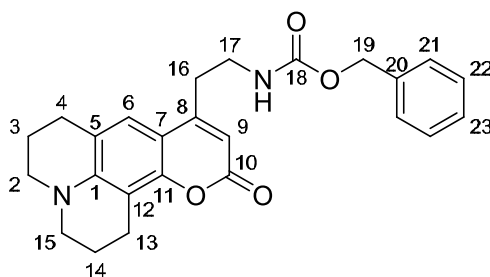
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 35.4$ (t, C-7), 42.8 (t, C-8), 49.0 (t, C-10), 52.4 (q, C-12), 66.7 (t, C-5), 128.0 (d, C-1/C-2/C-3), 128.1 (d, C-1/C-2/C-3), 128.5 (d, C-1/C-2/C-3), 136.4 (s, C-4), 156.3 (s, C-6), 167.2 (s, C-11), 202.1 (s, C-9).

[2-(10-Oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H,10H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-yl)-ethyl]-carbaminsäurebenzylester (14, Z-FFN)

Gemäß **AAV 4** wurden 189 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodin **12** mit 279 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) des Z- β -Alanin- β -Ketoesters **13** in Gegenwart von 2 ml (2.00 mmol, 2.00 Äq.) $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$ (1 M in Hexan) umgesetzt. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 326 mg (0.78 mmol, 79 % d. Th.) eines gelben Feststoffs **14** erhalten.

$R_f(\mathbf{14}) = 0.38$ (Hex:EE 1:1)



14

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

$\delta = 1.93$ – 2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.77 (t, $^3J_{16,17} = 6.0$ Hz, 2 H, 16-H), 2.87– 2.90 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 3.23– 3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.50 (td, $^3J_{17,16} = ^3J_{17,\text{NH}} = 6.4$ Hz, 2 H, 17-H), 4.89 (bs, 1 H, NH), 5.11 (s, 2 H, 19-H), 5.88 (s, 1 H, 9-H), 7.06 (s, 1 H, 6-H), 7.31– 7.38 (sh, 5 H, 21-H, 22-H, 23-H).

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

$\delta = 20.4$ (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 32.2 (t, C-16), 40.2 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 66.8 (t, C-19), 106.9 (s, C-7), 107.7 (d, C-9), 107.7 (s, C-12), 118.2 (d, C-5), 121.5 (s, C-6), 128.1 (d, C-21/C-22/C-23), 128.2 (d, C-21/C-22/C-23), 128.5 (d, C-21/C-22/C-23), 136.3 (s, C-20), 145.9 (s, C-1), 151.4 (s, C-11), 153.5 (s, C-8/C-18), 156.3 (s, C-8/C-18), 162.3 (s, C-10).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$	Ber.	C 71.75	H 6.26	N 6.69
(418.48)	Gef.	C 71.27	H 6.33	N 6.47

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$	418.1893	418.1902

Schmelzpunkt: 127–128 °C

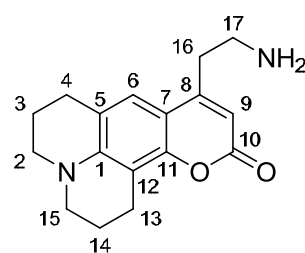
Absorptionsmax.: 391 nm

Emissionsmax.:	456 nm
Lebenszeit:	4.1 ns
Quantenausbeute:	1.0

8-(2-Amino-ethyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]-anthracen-10-on (**15**, FFN)

Gemäß **AAV 5** wurden 150 mg (0.36 mmol, 1.00 Äq.) des Z-geschützten Fluoreszenz-Labels **14** in 14 ml Methanol gelöst und mit 15 mg (10 Gew.-%) Katalysator versetzt. Nach Aufarbeitung wurden 102 mg (0.36 mmol, 100 % d. Th.) eines gelben Feststoffes **15** erhalten.

$R_f(\mathbf{15}) = 0.69$ (EE)



15

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

$\delta = 1.93\text{--}2.00$ (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.79–2.84 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 3.05 (t, $^3J_{16,17} = 7.6$ Hz, 2 H, 16-H), 3.22 (t, $^3J_{17,16} = 7.6$ Hz, 2 H, 17-H), 3.28–3.33 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 5.93 (s, 1 H, 9-H), 7.16 (s, 1 H, 6-H).

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

$\delta = 21.4$ (t, C-13), 21.6 (t, C-3/C-14), 22.5 (t, C-3/C-14), 28.7 (t, C-4), 30.9 (t, C-16), 39.9 (t, C-17), 50.4 (t, C-2/C-15), 50.9 (t, C-2/C-15), 101.4 (d, C-9), 107.8 (s, C-7/C-12), 108.4 (s, C-7/C-12), 120.5 (d, C-5), 122.5 (s, C-6), 147.8 (s, C-1), 152.7 (s, C-11), 154.4 (s, C-8), 164.5 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ [M] ⁺	284.1525	284.1511

Schmelzpunkt: 114–118 °C

Absorptionsmax.: 389 nm

Emissionsmax.: 454 nm

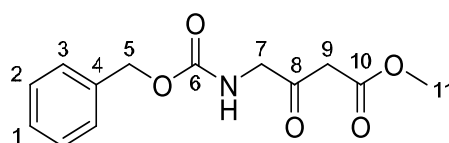
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

4-(Benzyloxycarbonylamino)-3-oxo-butansäuremethylester (16)

Gemäß **AAV 3** wurden 1.05 g (5.00 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Benzylcarbammat-geschütztem Glycin mit 972 mg (6.00 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 1.17 g (7.50 mmol, 1.50 Äq.) Mono-Methylkaliummalonat, das mit 495 mg (5.20 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 3:1→1:1) wurden 1.14 g (4.30 mmol, 86 % d. Th.) eines leicht gelben Feststoffs **16** erhalten.

$R_f(\mathbf{16}) = 0.29$ (Hex:EE 1:1)

**16**

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

$\delta = 3.50$ (s, 2 H, 9-H), 3.74 (s, 3 H, 11-H), 4.21 (d, $^3J_{7,\text{NH}} = 5.0$ Hz, 2 H, 7-H), 5.12 (s, 2 H, 5-H), 5.43 (bs, 1 H, NH), 7.30–7.38 (sh, 5 H, 1-H, 2-H, 3-H).

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

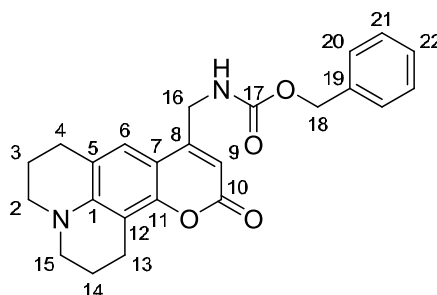
$\delta = 46.3$ (t, C-9), 50.9 (t, C-7), 52.6 (q, C-11), 67.2 (t, C-5), 128.1 (d, C-1/C-2/C-3), 128.2 (d, C-1/C-2/C-3), 128.6 (d, C-1/C-2/C-3), 136.2 (s, C-4), 156.1 (s, C-6), 166.8 (s, C-10), 197.9 (s, C-8).

Schmelzpunkt: 53–55 °C

(10-Oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*,10*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8-ylmethyl)-carbaminsäurebenzylester (17)

Gemäß **AAV 4** wurden 378 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodins **12** mit 531 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des *Z*-Glycin- β -Ketoesters **16** in Gegenwart von 4 ml (4.00 mmol, 2.00 Äq.) $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_3\text{Cl}$ (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 696 mg (1.72 mmol, 86 % d. Th.) eines gelben Feststoffes **17** erhalten.

$R_f(\mathbf{17}) = 0.27$ (Hex:EE 1:1)

**17**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.93–1.99 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.73 (t, $^3J_{4,3}$ = 6.2 Hz, 2 H, 4-H), 2.86 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.46 (d, $^3J_{16,NH}$ = 6.1 Hz, 2 H, 16-H), 5.15–5.18 (sh, 3 H, NH, 18-H), 6.00 (s, 1 H, 9-H), 6.96 (s, 1 H, 6-H), 7.32–7.37 (sh, 5 H, 20-H, 21-H, 22-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.4 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 41.3 (t, C-16), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 67.2 (t, C-18), 105.6 (d, C-9), 106.5 (s, C-7/C-12), 106.9 (s, C-7/C-12), 118.2 (s, C-5), 120.6 (d, C-6), 128.2 (d, C-20/C-21/C-22), 128.2 (d, C-20/C-21/C-22), 128.6 (d, C-20/C-21/C-22), 136.2 (s, C-19), 145.9 (s, C-1), 151.2 (s, C-11), 152.1 (s, C-8), 156.2 (s, C-17), 162.3 (s, C-10).

Elementaranalyse:

C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₄	Ber.	C 71.27	H 5.98	N 6.93
(404.46)	Gef.	C 70.86	H 6.08	N 6.89

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O ₄ [M] ⁺	404.1736	404.1737

Schmelzpunkt: 172–173 °C

Absorptionsmax.: 394 nm

Emissionsmax.: 460 nm

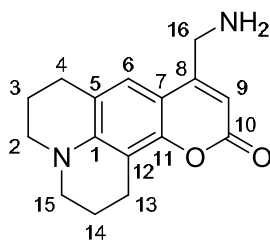
Lebenszeit: 4.4 ns

Quantenausbeute: 1.1

8-Aminomethyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on (18)

Gemäß **AAV 5** wurden 135 mg (0.33 mmol, 1.00 Äq.) des Z-geschützten Fluoreszenz-Labels **17** in 16 ml Methanol gelöst und mit 14 mg (10 Gew.-%) Katalysator versetzt. Nach Aufarbeitung wurden 89 mg (0.33 mmol, 100 % d. Th.) eines gelb-braunen Feststoffs **18** erhalten.

R_f(18) = 0.71 (EE)

**18**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.93–1.99 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.76 (t, $^3J_{4,3}$ = 6.3 Hz, 2 H, 4-H), 2.87 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.4 Hz, 2 H, 13-H), 3.23–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.44 (m, 2 H, 16-H), 4.94 (m, 2 H, NH), 6.00 (s, 1 H, 9-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

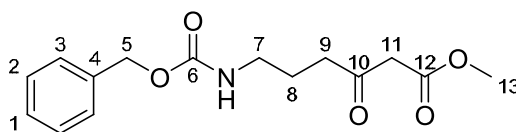
δ = 20.4 (t, C-13), 21.5 (t, C-3/C-14), 22.1 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 41.0 (t, C-16), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 105.4 (d, C-9), 106.5 (s, C-7/C-12), 106.9 (s, C-7/C-12), 118.2 (s, C-5), 120.7 (d, C-6), 145.9 (s, C-1), 151.2 (s, C-11), 152.6 (s, C-8), 162.5 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₂ [M] ⁺	270.1368	270.1381
Schmelzpunkt:	118–122 °C	
Absorptionsmax.:	389 nm	
Emissionsmax.:	460 nm	
Lebenszeit:	4.1 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

6-(Benzyloxycarbonylamino)-3-oxo-hexansäuremethylester (19)

Gemäß **AAV 3** wurden 7.15 g (30.0 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Benzylcarbamat-geschützter 4-Aminobuttersäure mit 6.23 g (38.4 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 7.50 g (48.0 mmol, 1.50 Äq.) Mono-Methylkaliummalonat, das mit 3.17 g (33.3 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 3:1→1:1) wurden 7.69 g (26.2 mmol, 87 % d. Th.) eines farblosen Feststoffs **19** erhalten.

R_f(19) = 0.27 (Hex:EE 1:1)

**19****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.81 (tt, $^3J_{8,7}$ = $^3J_{8,9}$ = 6.8 Hz, 2 H, 8-H), 2.60 (t, $^3J_{9,8}$ = 6.8 Hz, 2 H, 9-H), 3.22 (dt, $^3J_{7,NH}$ = 13.1 Hz, $^3J_{7,8}$ = 6.8 Hz, 2 H, 7-H), 3.44 (s, 2 H, 11-H), 3.72 (s, 3 H, 13-H), 4.88 (bs, 1 H, NH), 5.09 (s, 2 H, 5-H), 7.31–7.36 (sh, 5 H, 1-H, 2-H, 3-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

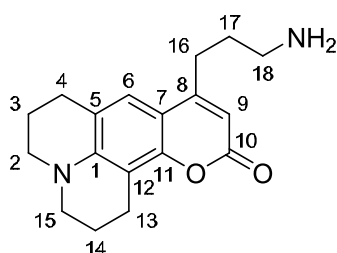
δ = 23.7 (t, C-8), 39.9 (t, C-9), 40.1 (t, C-7), 48.9 (t, C-11), 52.4 (q, C-13), 66.6 (t, C-5), 128.1 (d, C-1/C-2/C-3), 128.5 (d, C-1/C-2/C-3), 128.6 (d, C-1/C-2/C-3), 136.5 (s, C-4), 156.5 (s, C-6), 167.6 (s, C-12), 202.1 (s, C-10).

Schmelzpunkt: 47–48 °C

8-(3-Amino-propyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]-anthracen-10-on (20)

Gemäß **AAV 4** wurden 378 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodins **12** mit 586 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des Z-4-Amino- β -Ketoesters **19** in Gegenwart von 4.0 ml (4.00 mmol, 2.00 Äq.) $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$ (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch gemäß **AAV 5** in Methanol gelöst und mit 64 mg (10 Gew.-%) Katalysator versetzt. Nach Aufarbeitung, Ausfällen aus Ethanol und Umkristallisation aus Ethanol wurden 657 mg (1.52 mmol, 76 % d. Th.) eines gelben Feststoffes **20** erhalten.

$R_f(\mathbf{20}) = 0.70$ (EE)



20

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

$\delta = 1.80$ (m, 2 H, 17-H), 1.87–1.91 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.60 (t, $^3J_{16,17} = 7.5$ Hz, 2 H, 16-H), 2.70 (t, $^3J_{4,3} = 6.4$ Hz, 2 H, 4-H), 2.79 (t, $^3J_{13,14} = 6.4$ Hz, 2 H, 13-H), 3.14–3.20 (sh, 6 H, 2-H, 15-H, 18-H), 4.96 (t, $^3J_{\text{NH},18} = 5.5$ Hz, 2 H, NH), 5.81 (s, 1 H, 9-H), 6.91 (s, 1 H, 6-H).

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

$\delta = 20.7$ (t, C-13), 21.6 (t, C-3/C-14), 22.2 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 28.9 (t, C-16), 29.1 (t, C-17), 40.5 (t, C-18), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 107.0 (d, C-9), 107.1 (s, C-7/ C-12), 107.9 (s, C-7/C-12), 118.0 (s, C-5), 121.3 (d, C-6), 145.8 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 156.3 (s, C-8), 162.5 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ [M-H] ⁺	297.1603	297.1558

Schmelzpunkt: 88–92 °C

Absorptionsmax.: 389 nm

Emissionsmax.: 454 nm

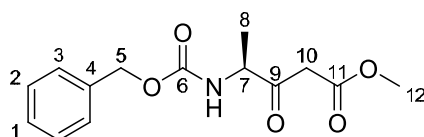
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

(S)-4-(Benzyloxycarbonylamino)-3-oxo-pentansäuremethylester (21)

Gemäß **AAV 3** wurden 1.12 g (5.00 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Benzylcarbamat-geschütztem L-Alanin mit 972 mg (6.00 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 1.17 g (7.50 mmol, 1.50 Äq.) Mono-Methylkaliummalonat, das mit 495 mg (5.20 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 3:1→1:1) wurden 1.14 g (4.05 mmol, 81 % d. Th.) eines leicht gelben Öls **21** erhalten.

$R_f(\mathbf{21}) = 0.53$ (Hex:EE 1:1)

**21**

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

$\delta = 1.39$ (d, $^3J_{8,7} = 7.1$ Hz, 3 H, 8-H), 3.56 (s, 2 H, 10-H), 3.73 (s, 3 H, 12-H), 4.47 (dq, $^3J_{7,\text{NH}} = ^3J_{7,8} = 7.0$ Hz, 1 H, 7-H), 5.11 (s, 2 H, 5-H), 5.42 (bs, 1 H, NH), 7.34–7.37 (sh, 5 H, 1-H, 2-H, 3-H).

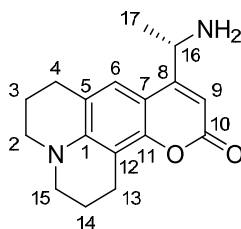
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 17.2$ (q, C-8), 45.6 (t, C-10), 52.5 (q, C-12), 55.8 (d, C-7), 67.1 (t, C-5) 128.1 (d, C-1/C-2/C-3), 128.3 (d, C-1/C-2/C-3), 128.6 (d, C-1/C-2/C-3), 136.1 (s, C-4), 156.6 (s, C-6), 167.1 (s, C-11), 201.6 (s, C-9).

(S)-8-(1-Amino-ethyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]-anthracen-10-on (22)

Gemäß **AAV 4** wurden 189 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodins **12** mit 279 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) des *Z*-Alanin- β -Ketoesters **21** in Gegenwart von 2.0 ml (2.00 mmol, 2.00 Äq.) $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_3\text{Cl}$ (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch gemäß **AAV 5** in Methanol gelöst und mit 34 mg (10 Gew.-%) Katalysator versetzt. Nach Aufarbeitung, Ausfällen aus Ethanol und Umkristallisation aus Ethanol wurden 343 mg (0.82 mmol, 82 % d. Th.) eines gelben Feststoffes **22** erhalten.

$R_f(\mathbf{22}) = 0.56$ (EE)

**22**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.46 (d, $^3J_{17,16}$ = 6.9 Hz, 3 H, 17-H), 1.93–1.99 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.77 (t, $^3J_{4,3}$ = 6.5 Hz, 2 H, 4-H), 2.88 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.89 (m, 1 H, 16-H), 5.10 (bs, 1H, NH), 6.02 (s, 1 H, 9-H), 7.07 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

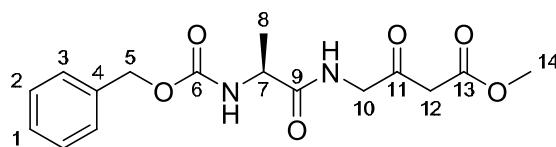
δ = 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 22.1 (q, C-17), 27.8 (t, C-4), 45.7 (d, C-16), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 103.8 (d, C-9), 106.4 (s, C-7/C-12), 107.0 (s, C-7/C-12), 118.2 (s, C-5), 121.0 (d, C-6), 145.9 (s, C-1), 151.5 (s, C-11), 157.9 (s, C-8), 162.8 (s, C-10).

HRMS (CI:)	Berechnet	Gefunden
C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂ [M] ⁺	284.1525	284.1527
Schmelzpunkt:	160–161 °C	
Absorptionsmax.:	370 nm	
Emissionsmax.:	457 nm	
Lebenszeit:	4.3 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

(S)-4-(2-(Benzyloxycarbonylamino)propanamido)-3-oxo-butansäuremethylester (23)

Gemäß **AAV 3** wurden 9.49 g (34.0 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Benzylcarbamat-geschütztem Dipeptid- β -Ketoester mit 7.20 g (44.4 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 8.67 g (55.5 mmol, 1.50 Äq.) Mono-Methylkaliummalonat, das mit 3.67 g (38.5 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und Umkristallisation aus Ethanol wurden 9.83 g (26.9 mmol, 79 % d. Th.) eines farblosen Feststoffs **23** erhalten.

R_f(23) = 0.06 (Hex:EE 1:1)

**23****¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 1.22 (d, $^3J_{8,7}$ = 7.1 Hz, 3 H, 8-H), 3.60 (s, 2 H, 12-H), 3.62 (s, 2 H, 14-H), 3.97–4.09 (sh, 3 H, 7-H, 10-H), 5.01 (s, 2 H, 5-H), 7.30–7.49 (sh, 5 H, 1-H, 2-H, 3-H), 7.48 (d, $^3J_{\text{NHAla},7}$ = 7.13 Hz, 1 H, NH-Ala), 8.21 (t, $^3J_{\text{NHGly},10}$ = 5.4 Hz, 1 H, NH-Gly).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

δ = 18.0 (q, C-8), 45.9 (t, C-12), 48.6 (t, C-10), 49.9 (d, C-7), 51.8 (q, C-14), 65.4 (t, C-5) 127.6 (d, C-1/C-2/C-3), 127.7 (d, C-1/C-2/C-3), 128.3 (d, C-1/C-2/C-3), 136.9 (s, C-4), 155.7 (s, C-6), 167.4 (s, C-13), 173.0 (s, C-9), 200.1 (s, C-11).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$	Ber.	C 57.14	H 5.99	N 8.33
(336.34)	Gef.	C 56.69	H 5.97	N 7.99

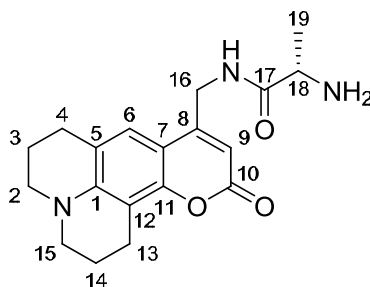
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6$ [M+H] $^+$	337.1400	337.1380

Schmelzpunkt: 92–94 °C

(S)-2-Amino-N-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]-anthracen-8-ylmethyl)-propionamid (24)

Gemäß **AAV 4** wurden 378 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodins **12** mit 673 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des Z-geschützten Dipeptid- β -Ketoesters **23** in Gegenwart von 4 ml (4.00 mmol, 2.00 Äq.) $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_3\text{Cl}$ (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch gemäß **AAV 5** in Methanol gelöst und mit 53 mg (10 Gew.-%) Katalysator versetzt. Nach Aufarbeitung, Ausfällen aus Ethanol und mehrmaliger Umkristallisation aus Ethanol wurden 525 mg (1.54 mmol, 77 % d. Th.) eines gelben Feststoffs **24** erhalten.

$R_f(\mathbf{24}) = 0.45$ (EE)



24

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

δ = 1.42 (d, $^3J_{19,18} = 6.5\text{Hz}$, 3 H, 19-H), 1.94–1.95 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.75 (t, $^3J_{4,3} = 5.3\text{Hz}$, 2 H, 4-H), 2.82 (t, $^3J_{13,14} = 5.3\text{Hz}$, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.30 (m, 1 H, 18-H), 4.52 (m, 2 H, 16-H), 5.20 (bs, 2 H, NH-Ala), 5.92 (s, 1 H, 9-H), 6.89 (bs, 1H, NH-“Gly”), 6.95 (s, 1 H, 6-H).

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

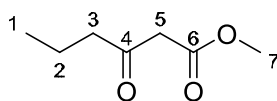
δ = 20.4 (q, C-19), 20.6 (t, C-13), 21.5 (t, C-3/C-14), 22.1 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 39.5 (t, C-16), 49.5 (2t, C-2, C-15), 49.9 (d, C-18), 105.7 (s, C-7/C-12), 106.6 (s, C-7/C-12), 106.9 (d, C-9), 118.2 (s, C-5), 120.9 (d, C-6), 146.0 (s, C-1), 151.2 (s, C-11), 152.0 (s, C-8), 162.4 (s, C-10), 172.7 (s, C-17).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$C_{19}H_{23}N_3O_3 [M]^+$	341.1739	341.1698
Schmelzpunkt:	187–191 °C	
Absorptionsmax.:	389 nm	
Emissionsmax.:	464 nm	
Lebenszeit:	4.4 ns	
Quantenausbeute:	1.1	

3-Oxohexansäuremethylester (25)

Gemäß **AAV 3** wurden 2.64 g (30.0 mmol, 1.00 Äq.) Buttersäure mit 5.84 g (36.0 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 7.30 g (45.0 mmol, 1.50 Äq.) Mono-Methylkaliummalonat, das mit 2.97 g (31.2 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE 9:1) wurden 3.78 g (26.0 mmol, 87 % d. Th.) eines farblosen Öls **25** erhalten.

$R_f(\mathbf{25}) = 0.48$ (Hexan:EE 8:2)



25

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

$\delta = 0.91$ (t, $^3J_{1,2} = 7.4$ Hz, 3 H, 1-H), 1.61 (m, 2 H, 2-H), 2.50 (t, $^3J_{3,2} = 7.3$ Hz, 2 H, 3-H), 3.43 (s, 2 H, 5-H), 3.72 (s, 3 H, 7-H).

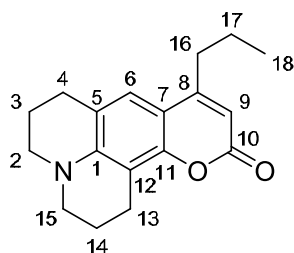
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 13.5$ (q, C-1), 16.9 (t, C-2), 44.9 (t, C-3), 49.0 (t, C-5), 52.2 (q, C-7), 167.6 (s, C-6), 202.6 (s, C-4).

8-Propyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]-anthracen-10-on (26)

Gemäß **AAV 4** wurden 378 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodin **12** mit 288 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des Buttersäure- β -Ketoesters **25** in Gegenwart von 4 ml (4.00 mmol, 2.00 Äq.) $\text{Ti}(\text{OiPr})_3\text{Cl}$ (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch gemäß **AAV 5** in Methanol gelöst und mit 45 mg (10 Gew.-%) Katalysator versetzt. Nach Aufarbeitung, Ausfällen aus Ethanol und Umkristallisation aus Ethanol wurden 446 mg (1.57 mmol, 79 % d. Th.) eines gelben Feststoffs **26** erhalten.

$R_f(\mathbf{26}) = 0.56$ (Hex:EE 1:1)



26

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.02 (t, $^3J_{18,17}$ = 7.4 Hz, 3 H, 18-H), 1.70 (m, 2 H, 17-H), 1.95–1.98 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.62 (t, $^3J_{16,17}$ = 7.5 Hz, 2 H, 16-H), 2.80 (t, $^3J_{4,3}$ = 6.5 Hz, 2 H, 4-H), 2.90 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.21–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 5.90 (s, 1 H, 9-H), 7.00 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 14.0 (q, C-18), 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-17), 21.6 (t, C-3/C-14), 21.9 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 33.8 (t, C-16), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 107.0 (d, C-9), 107.2 (s, C-7/C-12), 108.2 (s, C-7/C-12), 117.9 (s, C-5), 121.4 (d, C-6), 145.6 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 156.8 (s, C-8), 162.7 (s, C-10).

Elementaranalyse:

C ₁₈ H ₂₁ NO ₂	Ber.	C 76.29	H 7.47	N 4.94
(283.16)	Gef.	C 75.74	H 7.46	N 4.79

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₈ H ₂₂ NO ₂ [M+H] ⁺	284.1651	284.1647

Schmelzpunkt: 92–95 °C

Absorptionsmax.: 389 nm

Emissionsmax.: 454 nm

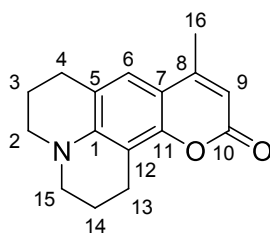
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

8-Methyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on (27)

Gemäß **AAV 4** wurden 3.78 g (20.0 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodin **12** mit 2.32 g (20.0 mmol, 1.00 Äq.) Acetessigsäuremethylester in Gegenwart von 40 ml (40.0 mmol, 2.00 Äq.) Ti(OiPr)₃Cl (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3, 6:4) wurden 3.73 g (14.6 mmol, 73 % d. Th.) eines ockerfarbenen Feststoffs **27** erhalten.

R_f(27) = 0.44 (Hex:EE 1:1)

**27**

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.95–1.98 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.30 (s, 3 H, 16-H), 2.77 (t, ³J_{4,3} = 6.3 Hz, 2 H, 4-H), 2.88 (t, ³J_{13,14} = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.21–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 5.89 (s, 1 H, 9-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 18.5 (q, C-16), 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 106.8 (d, C-9), 108.2 (s, C-7/C-12), 108.9 (s, C-7/C-12), 117.9 (s, C-5), 121.6 (d, C-6), 145.7 (s, C-1), 151.0 (s, C-11), 153.0 (s, C-8), 162.5 (s, C-10).

Elementaranalyse:

C ₁₆ H ₁₇ NO ₂	Ber.	C 75.27	H 6.71	N 5.49
(255.31)	Gef.	C 75.65	H 6.61	N 5.44

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₆ H ₁₇ NO ₂ [M] ⁺	255.1259	255.1259

Schmelzpunkt: 128–130 °C

Absorptionsmax.: 391 nm

Emissionsmax.: 454 nm

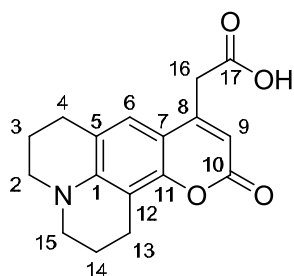
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

(10-Oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de] anthracen-8-yl)-essigsäure (28)

Gemäß **AAV 4** wurden 189 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodins **12** mit 174 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) des Dimethyl-3-oxopentandioats in Gegenwart von 2.0 ml (2.00 mmol, 2.00 Äq.) Ti(OiPr)₃Cl (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch zur Spaltung des Esters in 2 ml Methanol gelöst, mit 1 M NaOH versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Methanols, säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE 7:3), Ausfällen aus Ethanol (gemäß **AAV 4**) und Umkristallisation aus Ethanol wurden 508 mg (1.70 mmol, 85 % d. Th.) eines gelben Öls **28** erhalten.

R_f(28) = 0.16 (Hex:EE 1:1)



28

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.95–1.98 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.76 (t, $^3J_{4,3}$ = 6.4 Hz, 2 H, 4-H), 2.88 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.4 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.59 (s, 2 H, 16-H), 5.97 (s, 1 H, 9-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H), OH nicht sichtbar.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.5 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.7 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 38.6 (t, C-16), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 106.9 (s, C-7/C-12), 107.9 (s, C-7/C-12), 109.5 (d, C-9), 118.1 (s, C-5), 121.6 (d, C-6), 146.0 (s, C-1), 148.7 (s, C-11), 151.3 (s, C-8), 162.2 (s, C-10), 168.9 (s, C-17).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₇ H ₁₇ NO ₄ [M] ⁺	299.1158	299.1158

Absorptionsmax.: 404 nm

Emissionsmax.: 476 nm

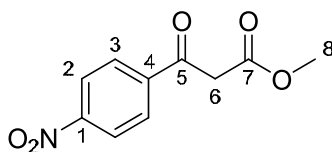
Lebenszeit: 4.3 ns

Quantenausbeute: 1.1

3-(4-Nitrophenyl)-3-oxo-propansäuremethylester(29)

Gemäß **AAV 3** wurden 5.01 g (30.0 mmol, 1.00 Äq.) 4-Nitrobenzoesäure mit 5.84 g (36.0 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 7.03 g (45.0 mmol, 1.50 Äq.) Mono-Methylkaliummalonat, das mit 2.97 g (31.2 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und Umkristallisation aus Ethanol wurden 5.49 g (24.6 mmol, 82 % d. Th.) eines gelben Feststoffs **29** erhalten.

R_f(29) = 0.57 (Hex:EE 1:1)



29

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 3.84 (s, 3 H, 8-H), 5.77 (s, 1 H, 6-H), 7.94 (d, ³J_{3,2} = 9.0 Hz, 2 H, 3-H), 8.28 (d, ³J_{2,3} = 9.0 Hz, 2 H, 2-H), 12.48 (s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 52.8 (q, C-8), 89.9 (d, C-6), 123.8 (d, C-2), 127.0 (d, C-3), 139.2 (s, C-4), 149.3 (s, C-1), 168.4 (s, C-7), 173.0 (s, C-5).

Elementaranalyse:

C ₁₀ H ₂ NO ₅ (223.18)	Ber. C 53.82	H 4.06	N 6.28
	Gef. C 53.93	H 4.07	N 6.12

HRMS (CI):

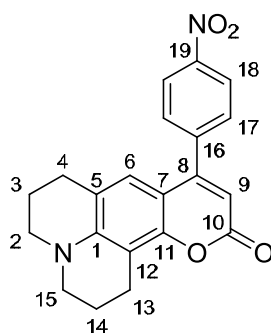
C ₇ H ₆ NO ₃ [M-CH ₂ COOMe+H] ⁺	Berechnet	Gefunden
	152.0348	152.0329

Schmelzpunkt: 103–106 °C

8-(4-Nitro-phenyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]-anthracen-on (30)

Gemäß **AAV 4** wurden 378 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodins **12** mit 446 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des aromatischen β-Ketoesters **29** in Gegenwart von 4 ml (4.00 mmol, 2.00 Äq.) Ti(OiPr)₃Cl (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE 9:1, 8:2) wurden 551 mg (1.52 mmol, 76 % d. Th.) eines roten Feststoffs **30** erhalten.

R_f(30) = 0.52 (Hex:EE 1:1)



30

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.95–2.05 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.68 (t, ³J_{4,3} = 6.2 Hz, 2 H, 4-H), 2.97 (t, ³J_{13,14} = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.29–3.33 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 5.98 (s, 1 H, 9-H), 6.64 (s, 1 H, 6-H), 7.61 (d, ³J_{17,18} = 8.8 Hz, 2 H, 17-H), 8.38 (d, ³J_{18,17} = 8.8 Hz, 2 H, 18-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.4 (t, C-13), 20.5 (t, C-3/C-14), 21.4 (t, C-3/C-14), 27.6 (t, C-4), 49.6 (t, C-2/C-15), 50.0 (t, C-2/C-15), 107.0 (d, C-9), 107.3 (s, C-7/C-12), 108.0 (s, C-7/C-12), 118.5 (s, C-5), 123.2 (d, C-6), 123.9 (d, C-18), 129.5 (d, C-17), 143.2 (s, C-1), 146.2 (s, C-19), 148.2 (s, C-11), 151.7 (s, C-16), 153.8 (s, C-8), 161.7 (s, C-10).

Elementaranalyse:

C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₄	Ber. C 69.60	H 5.01	N 7.73
(362.38)	Gef. C 69.30	H 5.02	N 7.38

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₄ [M] ⁺	362.1267	362.1257

Schmelzpunkt: 234–235 °C

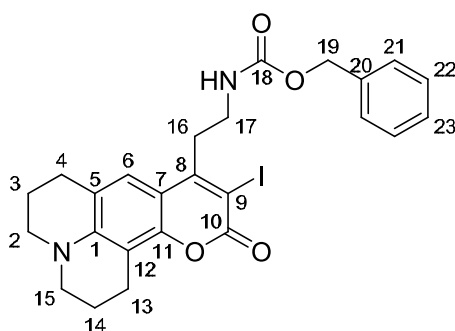
Absorptionsmax.: 377 nm

Emissionsmax.: keine Fluoreszenz

[2-(9-Iodo-10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]-anthracen-8-yl)-ethyl]-carbaminsäurebenzylester (31)

Zu einer Lösung aus 175 mg (0.42 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Benzylcarbamat-geschütztem Fluoreszenz-Label FFN **15** in 10 ml Acetonitril wurden 94.5 mg (0.42 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Iod-succinimid in 2 ml Acetonitril getropft. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Hex:EE 8:2, 7:3). Aus der Reaktion gingen 173 mg (0.32 mmol, 76 % d. Th.) eines gelben Feststoffs **31** hervor.

R_f(31) = 0.60 (Hex:EE 1:1)



31

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.93–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.79 (t, ³J_{16,17} = 6.0 Hz, 2 H, 16-H), 2.87–2.90 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 3.24–3.30 (sh, 6 H, 4-H, 2-H, 15-H), 3.47 (td, ³J_{17,16} = ³J_{17,NH} = 6.4 Hz, 2 H, 17-H), 5.02 (bs, 1 H, NH), 5.16 (s, 2 H, 19-H), 7.25 (s, 1 H, 6-H), 7.34–7.39 (sh, 5 H, 21-H, 22-H, 23-H).

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

δ = 20.4 (t, C-13), 20.5 (t, C-3/C-14), 21.4 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 38.0 (t, C-16), 39.6 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 66.8 (t, C-19), 83.3 (s, C-9), 106.2 (s, C-7), 108.2 (s, C-12), 118.8 (s, C-5), 122.5 (d, C-6), 128.1 (d, C-21/C-22/C-23), 128.2 (d, C-21/C-22/C-23), 128.6 (d, C-21/C-22/C-23), 136.4 (s, C-20), 146.3 (s, C-1), 150.6 (s, C-11), 156.5 (s, C-8/C-18), 156.7 (s, C-8/C-18), 159.0 (s, C-10).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{IN}_2\text{O}_4$	Ber.	C 55.16	H 4.63	N 5.15
(544.38)	Gef.	C 55.44	H 4.64	N 5.02

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{IN}_2\text{O}_4$ [M] ⁺	544.0859	544.0813

Schmelzpunkt: 169–172 °C

Absorptionsmax.: 410 nm

Emissionsmax.: 457 nm

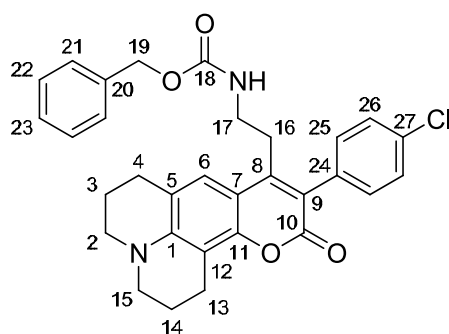
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

[2-(9-(4-Chloro-phenyl)-10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-yl)-ethyl]-carbaminsäurebenzylester (**32**)

327 mg (0.60 mmol, 1.00 Äq.) des Iod-Fluoreszenzderivates **31**, 215 mg (0.90 mmol, 1.50 Äq.) 2-(4-Chlorophenyl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan und 35 mg (5 mol-%) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ wurden in einem Schlenkkolben vorgelegt. Der Kolben wurde mit Stickstoff gespült und der Kolbeninhalt in 12 ml Dimethoxyethan gelöst. Nach Zugabe von 249 mg (1.80 mmol, 3.00 Äq.) K_2CO_3 in 1.0 ml dest. Wasser wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei 100 °C gerührt (Reaktionskontrolle). Das Reaktionsgemisch wurde auf RT abkühlen gelassen und säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Hex:EE 8:2 → 6:4). Aus der Suzuki-Kupplung gingen 302 mg (0.57 mmol, 92 % d. Th.) eines gelben Feststoffes **32** hervor.

$R_f(\mathbf{32}) = 0.21$ (Hex:EE 7:3)



32

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.93–2.01 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.80–2.84 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.91 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.4 Hz, 2 H, 13-H), 3.25–3.31 (sh, 6 H, 2-H, 15-H, 17-H), 4.74 (bs, 1 H, NH), 5.06 (s, 2 H, 19-H), 7.16–7.37 (sh, 10 H, 6-H, 21-H, 22-H, 23-H, 25-H, 26-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 29.9 (t, C-16), 40.7 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 50.0 (t, C-2/C-15), 66.7 (t, C-19), 106.7 (s, C-7), 107.8 (s, C-12), 118.5 (s, C-9), 119.9 (s, C-5), 122.5 (d, C-6), 128.0 (d, C-21/C-22/C-23/C-25), 128.2 (d, C-21/C-22/C-23/C-25), 128.5 (d, C-21/C-22/C-23/C-25), 128.8 (d, C-21/C-22/C-23/C-25), 131.7 (d, C-26), 133.7 (s, C-24/C-27), 133.9 (s, C-24/C-27), 136.3 (s, C-20), 145.8 (s, C-1), 149.2 (s, C-11), 150.7 (s, C-8), 156.2 (s, C-18), 161.9 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₃₁ H ₂₉ N ₂ O ₄ Cl [M] ⁺	528.1816	528.1827

Schmelzpunkt: 123–125 °C

Absorptionsmax.: 400 nm

Emissionsmax.: 495 nm

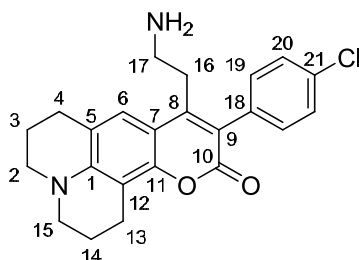
Lebenszeit: 3.4 ns

Quantenausbeute: 0.8

8-(2-Amino-ethyl)-9-(4-chloro-phenyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]-anthracen-10-on (33)

Zu 386 mg (0.73 mmol, 1.00 Äq.) des Z-geschützten Fluoreszenz-Labels **32** wurden bei 0 °C 715 μ l (4.00 Äq.) einer Lösung aus HBr in Eisessig (33 Gew-%) gegeben. Nach zweistündigem Stunden Rühren bei RT wurde Diethylether zum Reaktionsgemisch gegeben, wobei sich das entstandene Hydrobromid als Öl abschied. Der Ether wurde abdekantiert und das Rohprodukt erneut mit Ether versetzt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Um das freie Amin zu erhalten, wurde das Hydrobromid mit ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mehrmals mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Aus der Reaktion wurden 175 mg (0.45 mmol, 61 % d. Th.) eines gelben, zähen Öls **33** erhalten.

R_f(33) = 0.16 (Hexan:EE 7:3)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.94–1.98 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.68–2.90 (sh, 8 H, 4-H, 13-H, 16-H, 17-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 7.07–7.65 (sh, 5 H, 6-H, 19-H, 20-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.4 (t, C-13), 20.5 (t, C-3/C-14), 21.4 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 33.5 (t, C-16), 42.1 (t, C-17), 49.4 (t, C-2/C-15), 49.8 (t, C-2/C-15), 83.4 (s, C-9), 106.62 (s, C-7), 107.8 (s, C-12), 118.3 (s, C-5), 122.3 (d, C-6), 128.6 (d, C-19/C-20), 131.6 (d, C-19/C-20), 145.6 (s, C-1), 150.1 (s, C-11), 150.5 (s, C-8), 162.0 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₃ H ₂₃ N ₂ O ₂ Cl [M] ⁺	394.1448	394.1464

Absorptionsmax.: 403 nm

Emissionsmax.: 477 nm

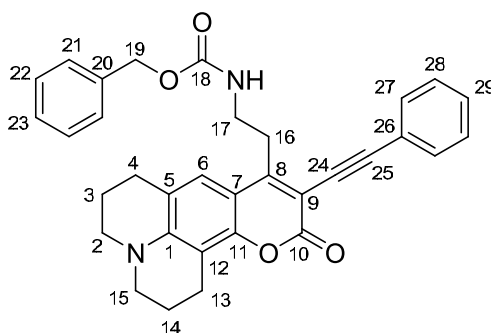
Lebenszeit: 3.4 ns

Quantenausbeute: 0.8

[2-(10-Oxo-9-phenylethynyl-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8-yl)-ethyl]-carbaminsäurebenzylester (**34**)

153 mg (0.28 mmol, 1.00 Äq.) des Iod-Fluoreszenzderivates **31**, 33 µl (32 mg, 0.31 mmol, 1.10 Äq.) Phenylacetylen, 6 mg (0.03 mmol, 0.10 Äq.) Kupfer(I)iodid und 9 mg (3 mol-%) Pd(PPh₃)₄ wurden in einem Schlenkkolben vorgelegt. Der Kolben wurde mit Stickstoff gespült und der Kolbeninhalt in 7 ml Dimethoxyethan gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 100°C gerührt (Reaktionskontrolle). Nach Verdünnen mit dest. H₂O, dreimaliger Extraktion mit Dichlormethan und Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, Hexan:EE 8:2, 7:3) gereinigt. Aus der Sonogashira-Kupplung gingen 74 mg (0.14 mmol, 51 % d. Th.) eines gelben zähen Öls **34** hervor.

R_f (**34**) = 0.21 (PE:EE 7:3)



34

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.86–1.90 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.70–2.82 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 3.14–3.32 (sh, 4 H, 16-H, 17-H), 3.33–3.41 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.95–5.06 (sh, 3 H, 19-H, NH), 7.24–7.28 (sh, 11 H, 6-H, 21-H, 22-H, 23-H, 27-H, 28-H, 29-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.4 (t, C-13), 20.4 (t, C-3/C-14), 21.4 (t, C-3/C-14), 30.1 (t, C-4), 35.4 (t, C-16), 43.2 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.6 (t, C-2/C-15), 69.2 (t, C-19), 89.9 (s, C-24), 100.0 (s, C-25), C-7, C-9, C-12, C-5 nicht sichtbar, 128.1 (s, C-6), 128.1–128.6 (6d, C-21, C-22, C-23, C-27, C-28, C-29), 136.4 (s, C-20/C-26), 136.5 (s, C-20/C-26), 146.8 (s, C-1), C-11, C-8 nicht sichtbar, 156.1 (s, C-18), 166.4 (s, C-10).

HRMS (ESI):	Berechnet	Gefunden
C ₃₄ H ₃₂ N ₂ O ₆ [M+HCOOH] ⁺	564.2260	564.1944

Absorptionsmax.: 400 nm

Emissionsmax.: 453 nm

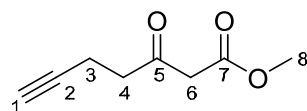
Lebenszeit: 3.4 ns

Quantenausbeute: 0.8

3-Oxo-hept-6-insäuremethylester (35)

Gemäß **AAV 3** wurden 930 mg (9.48 mmol, 1.00 Äq.) Pent-4-insäure mit 1.85 g (11.4 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 2.22 g (14.2 mmol, 1.50 Äq.) Mono-Methylkaliummalonat, das mit 938 mg (9.86 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hex:EE 8:2) wurden 1.20 g (7.78 mmol, 82 % d. Th.) eines leicht gelben Öls **35** erhalten.

R_f(35) = 0.40 (Hex:EE 7:3)

**35****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.96 (t, ⁴J_{1,3} = 2.7 Hz, 1 H, 1-H), 2.47 (td, ³J_{3,4} = 7.2 Hz, ⁴J_{3,1} = 2.7 Hz, 2 H, 3-H), 2.81 (t, ³J_{4,3} = 7.2 Hz, 1 H, 4-H), 3.48 (s, 2 H, 6-H), 3.74 (s, 3 H, 8-H).

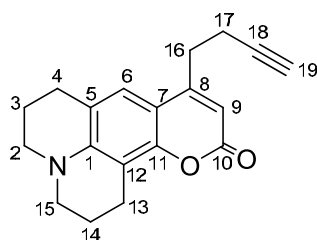
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 12.8 (t, C-3), 41.6 (t, C-4), 48.9 (t, C-6), 52.4 (q, C-8), 69.0 (d, C-1), 82.4 (s, C-2), 167.3 (s, C-7), 200.4 (s, C-5).

8-(But-4-ynyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-benzo[*de*]-anthracen-10-on (36)

Gemäß **AAV 4** wurden 378 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodins **12** mit 308 mg (2.00 mmol, 1.00 Äq.) des 3-Oxohept-6-insäuremethylester **35** in Gegenwart von 4.0 ml (4.00 mmol, 2.00 Äq.) Ti(OiPr)₃Cl (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Hex:EE 7:3) wurden 508 mg (1.73 mmol, 87 % d. Th.) eines gelben Feststoffs **36** erhalten.

R_f(36) = 0.23 (Hex:EE 7:3)



36

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.93–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.04 (t, ⁴J_{19,17} = 2.6 Hz, 1 H, 19-H), 2.54 (td, ³J_{17,16} = 7.4 Hz, ⁴J_{17,19} = 2.6 Hz, 2 H, 17-H), 2.77 (t, ³J_{16,17} = 6.3 Hz, 2 H, 16-H), 2.86–2.90 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 5.94 (s, 1 H, 9-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 17.9 (t, C-17), 20.5 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 30.6 (t, C-16), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 69.9 (d, C-19), 82.5 (s, C-18), 107.0 (d, C-9), 107.4 (s, C-7/C-12), 107.6 (s, C-7/C-12), 118.0 (s, C-5), 121.0 (d, C-6), 145.8 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 154.1 (s, C-8), 162.4 (s, C-10).

Elementaranalyse:

C ₁₉ H ₁₉ NO ₂	Ber.	C 77.79	H 6.53	N 4.77
(293.36)	Gef.	C 77.54	H 6.71	N 4.69

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₉ H ₁₉ NO ₂ [M] ⁺	293.1416	293.1427

Schmelzpunkt: 125–127 °C

Absorptionsmax.: 393 nm

Emissionsmax.: 457 nm

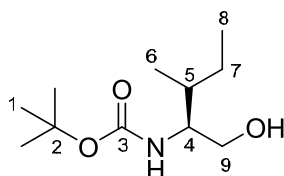
Lebenszeit: 4.1 ns

Quantenausbeute: 1.1

(S)-tert-Butyl-1-hydroxy-3-methylpentan-2-ylcarbamat (37)

Zu einer Lösung aus 2.45 g (10.0 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Boc-Isoleucinmethylester in 12 ml THF wurden bei RT 756 mg (20.0 mmol, 2.00 Äq.) Natriumborhydrid und 848 mg (20.0 mmol, 2.00 Äq.) Lithiumchlorid in 24 ml Ethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit 40 ml 10 %-iger Zitronensäurelösung hydrolysiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der wässrige Rückstand dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit Wasser und ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3) wurden 1.88 g (8.65 mmol, 87 % d. Th.) eines farblosen Öls **37** erhalten.

$R_f(\mathbf{37}) = 0.19$ (PE:EE 7:3)

**37**

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

$\delta = 0.89\text{--}0.92$ (sh, 6 H, 6-H, 8-H), 1.14 (m, 1 H, 5-H), 1.45 (s, 9 H, 1-H), 1.48–1.61 (sh, 2 H, 7-H, 7'-H), 2.33 (bs, 1 H, OH), 3.51 (bs, 1 H, 4-H), 3.61 (dd, $^2J_{9,9'} = 10.7$ Hz, $^3J_{9,4} = 6.6$ Hz, 1 H, 9-H), 3.71 (dd, $^2J_{9',9} = 10.7$ Hz, $^3J_{9',4} = 4.5$ Hz, 1 H, 9'-H), 4.67 (bs, 1 H, NH).

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

$\delta = 11.5$ (q, C-8), 15.5 (q, C-6), 25.5 (t, C-7), 28.4 (q, C-1), 36.2 (d, C-5), 57.1 (d, C-4), 64.1 (t, C-9), 79.6 (s, C-2), 156.8 (s, C-3).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	Ber.	C 60.80	H 10.67	N 6.45
(217.31)	Gef.	C 61.10	H 10.65	N 6.07

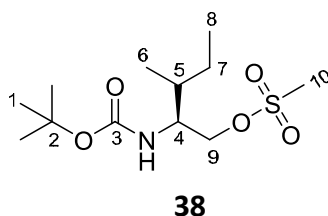
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ [M] ⁺	217.1678	217.1660

(S)-2-(tert-Butoxycarbonylamino)-3-methylpentyl-methansulfonat (38)

Eine Lösung aus 1.00 g (4.60 mmol, 1.00 Äq.) des Alkohols **37** und 1.45 g (14.3 mmol, 3.10 Äq.) Triethylamin in 23 ml abs. Dichlormethan wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 790 mg (6.90 mmol, 1.50 Äq.) Methansulfonylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei 0 °C gerührt. Nach Verdünnen mit Dichlormethan wurde mit 1 M KHSO_4 -Lösung, zweimal mit ges. NaHCO_3 -Lösung, dest. Wasser und ges. NaCl -Lösung gewaschen.

Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, PE:EE 7:3), sodass aus der Reaktion 1.30 g (4.42 mmol, 96 % d. Th.) eines farblosen Öls **38** hervorgingen.

$R_f(\mathbf{38}) = 0.21$ (PE:EE 7:3)



Die Verbindung ist instabil und zersetzt sich schnell.

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

$\delta = 0.90\text{--}0.96$ (sh, 6 H, 6-H, 8-H), 1.16 (m, 1 H, 5-H), 1.45 (s, 9 H, 1-H), 1.51–1.66 (sh, 2 H, 7-H, 7'-H), 3.02 (s, 3 H, 10-H), 3.70 (bs, 1 H, 4-H), 4.24–4.31 (sh, 2 H, 9-H, 9'-H), 4.63 (d, $^3J_{\text{NH},4} = 7.7$ Hz, 1 H, NH).

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

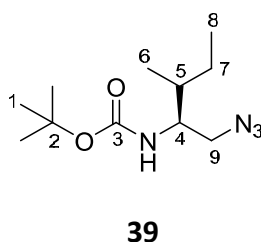
$\delta = 11.1$ (q, C-8), 15.4 (q, C-6), 25.2 (t, C-7), 28.3 (q, C-1), 35.6 (d, C-5), 37.4 (q, C-10), 53.8 (d, C-4), 69.7 (t, C-9), 79.8 (s, C-2), C-3 nicht sichtbar.

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{NO}_5\text{S} [\text{M}]^+$	295.1453	293.1474

(S)-tert-Butyl-1-azido-3-methylpentan-3-yl-carbamat (**39**)

Zu einer Lösung aus 1.30 g (4.40 mmol, 1.00 Äq.) des Mesylates **38** in 44 ml abs. DMF wurden 2.22 g (34.2 mmol, 7.80 Äq.) Natriumazid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 15 h auf 60 °C erwärmt. Das abgekühlte Gemisch wurde mit 100 ml dest. Wasser und 100 ml Ethylacetat verdünnt und im Scheidetrichter wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen dreimal mit dest. Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen sowie über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 8:2) wurden 782 mg (3.23 mmol, 73 % d. Th.) eines farblosen Feststoffs **39** erhalten.

$R_f(\mathbf{39}) = 0.45$ (PE:EE 8:2)



Das Azid ist stabil und kann bei RT gelagert werden.

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

δ = 0.89–0.93 (sh, 6 H, 6-H, 8-H), 1.12 (m, 1 H, 5-H), 1.45–1.58 (sh, 11 H, 1-H, 7-H, 7'-H), 3.42 (sh, 2 H, 9-H, 9'-H), 3.58 (bs, 1 H, 4-H), 4.55 (d, $^3J_{\text{NH},4} = 7.3$ Hz, 1 H, NH).

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

δ = 11.3 (q, C-8), 15.5 (q, C-6), 25.2 (t, C-7), 28.4 (q, C-1), 36.3 (d, C-5), 52.9 (t, C-9), 54.4 (d, C-4), 79.6 (s, C-2), 155.5 (s, C-3).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$	Ber.	C 54.52	H 9.15	N 23.12
(242.32)	Gef.	C 54.52	H 8.77	N 22.94

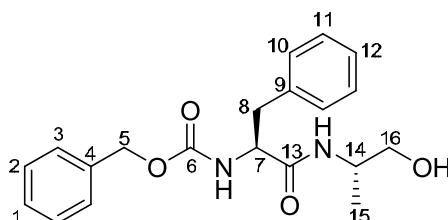
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_4$ [M] ⁺	243.1821	243.1793

Schmelzpunkt: 48–50 °C

(*S,S*)-Benzyl-1-(1-hydroxypropan-2-ylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamate (**40**)

Zu einer Lösung aus 2.27 g (5.90 mmol, 1.00 Äq.) Z-Phenylalanyl-alaninmethylester in 7 ml THF wurden bei RT 446 mg (11.8 mmol, 2.00 Äq.) Natriumborhydrid und 500 mg (11.8 mmol, 2.00 Äq.) Lithiumchlorid in 14 ml Ethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit 24 ml 10 %-iger Zitronensäurelösung hydrolysiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der wässrige Rückstand dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit Wasser und ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 1:1, EE) wurden 1.68 g (4.71 mmol, 80 % d. Th.) eines farblosen Feststoffs **40** erhalten.

$R_f(\mathbf{40}) = 0.10$ (PE:EE 1:1)



40

Hauptdiastereomer (90 %):**¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):**

δ = 1.04 (d, $^3J_{15,14}$ = 6.8 Hz, 3 H, 15-H), 2.15 (bs, 1 H, OH), 2.99 (dd, $^2J_{8,8'}$ = 13.5 Hz, $^3J_{8,7}$ = 8.1 Hz, 1 H, 8-H), 3.11 (dd, $^2J_{8',8}$ = 13.5 Hz, $^3J_{8',7}$ = 6.3 Hz, 1 H, 8'-H), 3.22 (dd, $^2J_{16,16'}$ = 11.2 Hz, $^3J_{16,14}$ = 5.2 Hz, 1 H, 16-H), 3.41 (dd, $^2J_{16',16}$ = 11.2 Hz, $^3J_{16',14}$ = 3.6 Hz, 1 H, 16'-H), 3.94 (m, 1 H, 14-H), 4.36 (m, 1 H, 7-H), 5.08 (s, 2 H, 5-H), 5.51 (d, $^3J_{\text{NH-Phe},7}$ = 5.2 Hz, 1 H, NH-Phe), 5.86 (d, $^3J_{\text{NH-“Ala”},14}$ = 5.9 Hz, 1 H, NH-“Ala”), 7.07–7.37 (sh, 10 H, 1-H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H, 12-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 16.7 (q, C-15), 39.0 (t, C-8), 47.6 (d, C-14), 56.6 (d, C-7), 66.1 (t, C-5/C-16), 67.1 (t, C-5/C-16), 127.1 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.1 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.2 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.5 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.8 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 136.1 (s, C-4/C-9), 136.5 (s, C-4/C-9), 156.0 (s, C-6), 170.8 (s, C-13).

Nebendiastereomer (10 %, ausgewählte Signale):**¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):**

δ = 4.57 (m, 1 H, 7-H), 5.00 (s, 2 H, 5-H), 5.27 (d, $^3J_{\text{NH-Phe},7}$ = 5.2 Hz, 1 H, NH-Phe), 6.15 (d, $^3J_{\text{NH-“Ala”},14}$ = 5.9 Hz, 1 H, NH-“Ala”).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 16.6 (q, C-15), 47.8 (t, C-14), 56.7 (d, C-7), 67.4 (t, C-5/C-16), 128.6 (d, C-1/C-2/C-10/C-11/C-12), 128.7 (d, C-1/C-2/C-10/C-11/C-12), 128.8 (d, C-1/C-2/C-10/C-11/C-12), 129.2 (d, C-1/C-2/C-10/C-11/C-12), 129.2 (d, C-1/C-2/C-10/C-11/C-12), 136.3 (s, C-4/C-9), 170.3 (s, C-13).

Elementaranalyse:

C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₄	Ber.	C 67.40	H 6.79	N 7.86
(356.42)	Gef.	C 67.17	H 6.94	N 7.71

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₄ [M] ⁺	356.1735	356.1707

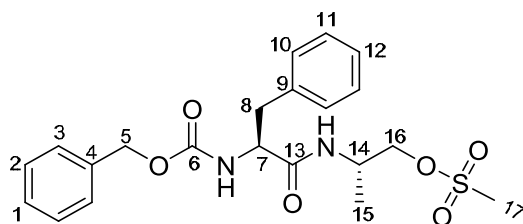
Schmelzpunkt: 110–114 °C

(S,S)-2-(2-(Benzylcarbonylamino)-3-phenylpropanamido)-propylmethansulfonat (41)

Eine Lösung aus 500 mg (1.40 mmol, 1.00 Äq.) des Alkohols **40** und 440 ml (4.34 mmol, 3.10 Äq.) Triethylamin in 27 ml abs. Dichlormethan wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 241 mg (2.10 mmol, 1.50 Äq.) Methansulfonylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei 0 °C gerührt. Nach Verdünnen mit Dichlormethan wurde mit 1 M KHSO₄-Lösung, zweimal mit ges. NaHCO₃-Lösung, dest. Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am

Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt (302 mg, 0.69 mmol, 49 % d. Th.) wurde ohne weitere Reinigung zum Azid umgesetzt.

$R_f(\mathbf{41}) = 0.23$ (PE:EE 1:1)



41

Die Verbindung ist instabil und zersetzt sich schnell.

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

$\delta = 1.27$ (d, $^3J_{15,14} = 6.8$ Hz, 3 H, 15-H), 2.73 (s, 3 H, 17-H), 3.03–3.20 (sh, 2 H, 8-H, 8'-H), 3.48 (m, 1 H, 14-H), 4.01 (dd, $^2J_{16,16'} = 11.5$ Hz, $^3J_{16,14} = 5.8$ Hz, 1 H, 16-H), 4.36 (m, 1 H, 16'-H), 4.71 (m, 1 H, 7-H), 5.09 (s, 2 H, 5-H), 6.02 (d, $^3J_{\text{NH-Phe},7} = 8.6$ Hz, 1 H, NH-Phe), 7.11–7.35 (sh, 11 H, NH-“Ala”, 1-H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H, 12-H).

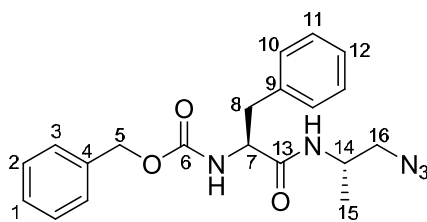
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 15.1$ (q, C-15), 38.0 (t, C-8), 39.4 (q, C-17), 46.7 (d, C-14), 55.4 (d, C-7), 65.4 (t, C-16), 66.8 (t, C-5), 127.0 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.0 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.1 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.5 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.6 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 129.5 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 136.0 (s, C-4/C-9), 136.2 (s, C-4/C-9), 155.5 (s, C-6), 171.1 (s, C-13).

(S,S)-Benzyl-1-(1-azidopropan-2-ylamino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-ylcarbamat (42)

Zu einer Lösung aus 200 mg (0.46 mmol, 1.00 Äq.) des Mesylates **41** in 5 ml abs. DMF wurden 232 mg (3.58 mmol, 7.77 Äq.) Natriumazid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 15 h auf 60 °C erwärmt. Das abgekühlte Gemisch wurde mit 10 ml dest. Wasser und 10 ml Ethylacetat verdünnt und im Scheidetrichter wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen dreimal mit dest. Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen sowie über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3, 6:4) wurden 204 mg (0.53 mmol, 77 % d. Th.) eines farblosen, zähen Öls **42** erhalten.

$R_f(\mathbf{42}) = 0.15$ (PE:EE 7:3)



42

Das Azid ist stabil und kann bei RT gelagert werden.

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

$\delta = 1.06$ (d, $^3J_{15,14} = 6.8$ Hz, 3 H, 15-H), 2.96–3.32 (sh, 3 H, 8-H, 8'-H, 16-H), 3.80 (m, 1 H, 16'-H), 4.07 (m, 1 H, 14-H), 4.41 (m, 1 H, 7-H), 5.08 (s, 2 H, 5-H), 5.44 (d, $^3J_{\text{NH-Phe},7} = 6.6$ Hz, 1 H, NH-Phe), 5.79 (bs, 1 H, NH-“Ala”), 7.11–7.35 (sh, 10 H, 1-H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H, 12-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6):

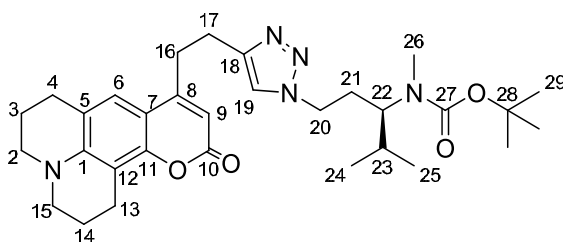
$\delta = 17.2$ (q, C-15), 38.5 (t, C-8), 47.4 (d, C-14), 56.8 (d, C-7), 65.1 (t, C-16), 66.1 (t, C-5), 126.7 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 127.8 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.1 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.4 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 128.7 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 129.6 (d, C-1/C-2/C-3/C-10/C-11/C-12), 137.5 (s, C-4/C-9), 138.2 (s, C-4/C-9), 156.0 (s, C-6), 171.1 (s, C-13).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3$ [M] ⁺	381.1801	381.1819

(S)-N-Methyl-[2-methyl-1-(2-{5-[2-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-azabeno[de]anthracen-8-yl)-ethyl]-[1,2,3]triazol-1-yl)-ethyl]-propyl]-carbaminsäure-tert-butylester (43)

Analog **AAV 6** wurden 86 mg (0.34 mmol, 1.00 Äq.) (*S*)-*tert*-Butyl-1-azido-4-methylpentan-3-yl(methyl)carbammat^[151] und 150 mg (0.51 mmol, 1.50 Äq.) des fluoreszierenden Alkins **36** in einer 3:1 Mischung aus DMSO und dest. Wasser (8 ml) zur Reaktion gebracht. Die heterogene Mischung wurde sechs Tage stark gerührt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 9:1, 7:3, 1:1) wurden 154 mg (0.28 mmol, 82 % d. Th.) eines braunen, glasartigen Öls **43** erhalten.

$R_f(\mathbf{43}) = 0.24$ (Hexan:EE 1:1)



43

Hauptrotamer (70 %):**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 0.82–0.89 (sh, 6 H, 24-H, 25-H), 1.46 (s, 9 H, 29-H), 1.68 (m, 1 H, 23-H), 1.90–1.98 (sh, 5 H, 3-H, 14-H, 21-H), 2.17 (m, 1 H, 21'-H), 2.64 (s, 3 H, 26-H), 2.76 (t, ³J_{4,3} = 6.5 Hz, 2 H, 4-H), 2.87 (t, ³J_{13,14} = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.03–3.07 (sh, 4 H, 16-H, 17-H), 3.21–3.26 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.78 (m, 1 H, 22-H), 4.19 (m, 2 H, 20-H), 5.87 (s, 1 H, 9-H), 7.05 (s, 1 H, 6-H), 7.41 (s, 1H, 19-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 19.4 (q, C-24/C-25), 20.0 (q, C-24/C-25), 20.5 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 24.7 (t, C-16), 27.7 (t, C-4), 28.4 (q, C-26/C-29), 28.4 (q, C-26/C-29), 30.3 (t, C-21/d, C-23), 30.4 (t, C-21/d, C-23), 31.3 (t, C-17), 47.7 (t, C-20), 49.4 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 58.6 (d, C-22), 79.6 (s, C-28), 106.7 (d, C-9), 107.0 (s, C-7/C-12), 107.8 (s, C-7/C-12), 118.0 (s, C-5), 121.4 (d, C-6/C-19), 121.8 (s, C-6/C-19), 145.7 (s, C-1/C-18), 146.0 (s, C-1/C-18), 151.3 (s, C-11), 155.6 (s, C-8/C-27), 156.6 (s, C-8/C-27), 162.5 (s, C-10).

Nebenrotamer (30 %, ausgewählte Signale):**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.24 (s, 9 H, 29-H), 2.69 (s, 3 H, 26-H), 2.98–2.99 (sh, 4 H, 16-H, 17-H), 5.86 (s, 1 H, 9-H), 7.04 (s, 1 H, 6-H), 7.26 (s, 1 H, 19-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 19.7 (q, C-24/C-25), 20.1 (q, C-24/C-25), 21.6 (t, C-3/C-14), 29.6 (q, C-26/C-29), 30.1 (t, C-21/d, C-23), 30.7 (t, C-21/d, C-23), 31.9 (t, C-16), 79.9 (s, C-28), 107.0 (s, C-7/C-12), 107.8 (s, C-7/C-12), 121.3 (d, C-6/C-19), 121.3 (s, C-6/C-19), 145.7 (s, C-1/C-18), 155.5 (s, C-8/C-27), 156.2 (s, C-8/C-27), 162.5 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₃₁ H ₄₃ N ₅ O ₄ [M] ⁺	549.3315	549.3293

Absorptionsmax.: 395 nm

Emissionsmax.: 455 nm

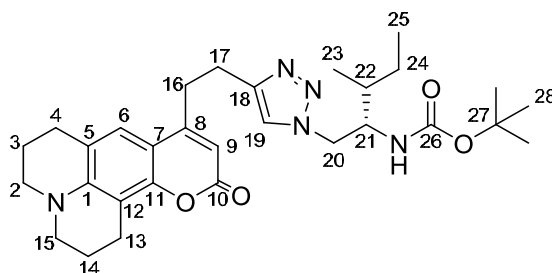
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

(S)-4-Methyl-3-{4-[2-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-yl)-ethyl]-[1,2,3]triazol-1-ylmethyl}-hexansäure-tert-butylester (44)

Analog **AAV 6** wurden 97 mg (0.40 mmol, 1.00 Äq.) (*S*)-*tert*-Butyl-1-azido-3-methylpentan-3-yl-carbamat **39** und 176 mg (0.60 mmol, 1.50 Äq.) des fluoreszierenden Alkins **36** in einer 3:1 Mischung aus DMSO und dest. Wasser (8 ml) zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 9:1, 7:3, 1:1, EE) wurden 168 mg (0.31 mmol, 78 % d. Th.) eines ockerfarbenen Feststoffs **44** erhalten.

R_f(44) = 0.10 (PE:EE 1:1)

**44****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 0.92 (t, $^3J_{25,24}$ = 7.3 Hz, 3 H, 25-H), 0.99 (d, $^3J_{23,22}$ = 6.7 Hz, 3 H, 23-H), 1.18 (m, 1 H, 22-H), 1.38 (s, 9 H, 28-H), 1.51 (m, 2 H, 24-H), 1.94–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.77 (t, $^3J_{4,3}$ = 6.3 Hz, 2 H, 4-H), 2.88 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 2.98–3.07 (sh, 4 H, 16-H, 17-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.83 (m, 1 H, 21-H), 4.39–4.49 (sh, 2 H, 20-H, 20'-H), 4.67 (d, $^3J_{\text{NH},21}$ = 8.7 Hz, 1 H, NH), 5.86 (s, 1 H, 9-H), 7.06 (s, 1 H, 6-H), 7.35 (s, 1H, 19-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

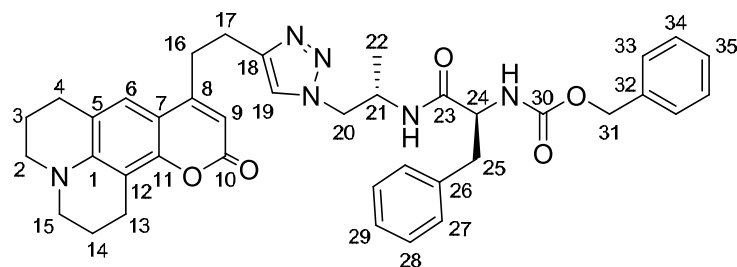
δ = 11.2 (q, C-23/C-25), 15.6 (q, C-23/C-25), 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 24.7 (t, C-16), 25.0 (t, C-24), 27.7 (t, C-4), 28.3 (q, C-28), 31.3 (t, C-17), 36.3 (d, C-22), 49.4 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 51.3 (t, C-20), 55.0 (d, C-21), 79.7 (s, C-27), 107.0 (d, C-9), 107.1 (s, C-7/C-12), 107.8 (s, C-7/C-12), 118.1 (s, C-5), 121.4 (d, C-6/C-19), 121.8 (s, C-6/C-19), 145.8 (s, C-1/C-18), 146.1 (s, C-1/C-18), 151.3 (s, C-11), 155.5 (s, C-8), C-26 nicht sichtbar, 155.5 (s, C-8), 162.5 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₃₀ H ₄₁ N ₅ O ₄ [M] ⁺	535.3159	535.3129
Schmelzpunkt:	205–208 °C	
Absorptionsmax.:	394 nm	
Emissionsmax.:	456 nm	
Lebenszeit:	4.0 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

(S,S)-[1-(1-Methyl-2-{4-[2-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-yl)ethyl]-[1,2,3]triazol-1-yl}ethylcarbamoyl)-2-phenyl-ethyl]-carbaminsäurebenzylester (45)

Anaolg **AAV 6** wurden 114 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des Dipeptidazids **42** und 132 mg (0.45 mmol, 1.50 Äq.) des fluoreszierenden Alkins **36** in einer 3:1 Mischung aus DMSO und dest. Wasser (8 ml) zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 1:1, EE) wurden 158 mg (0.23 mmol, 78 % d. Th.) eines gelb-braunen, zähen Öls **45** erhalten.

R_f(45) = 0.15 (EE)



45

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ = 0.97 (m, 3 H, 22-H), 1.87–1.96 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.73–2.86 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 2.93–3.10 (sh, 6 H, 16-H, 17-H, 25-H), 3.18–3.25 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.15–4.39 (sh, 4 H, 20-H, 21-H, 24-H), 4.97 (s, 2 H, 31-H), 5.52 (d, $^3J_{\text{NH-Phe},24} = 7.3$ Hz, 1 H, NH-Phe), 5.66 (s, 1 H, 9-H), 6.55 (d, $^3J_{\text{NH-„Ala“},21} = 6.9$ Hz, 1 H, NH-„Ala“), 7.04 (s, 1 H, 6-H), 7.18–7.29 (sh, 11 H, 19-H, 27-H, 28-H, 29-H, 33-H, 34-H, 35-H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ = 17.2 (q, C-22), 19.9 (t, C-13), 20.1 (t, C-3/C-14), 20.9 (t, C-3/C-14), 24.1 (t, C-16), 26.9 (t, C-4), 30.5 (t, C-17), 37.4 (t, C-25), 44.9 (d, C-21), 48.6 (t, C-2/C-15), 49.1 (t, C-2/C-15), 53.1 (t, C-20), 56.1 (d, C-24), 65.1 (t, C-31), 105.6 (d, C-9), 106.1 (s, C-7/C-12), 107.0 (s, C-7/C-12), 117.7 (s, C-5), 121.5 (d, C-6), 122.8 (d, C-19), 126.1–129.1 (d, C-Aromaten), 137.0 (s, C-26/C-32), 138.1 (s, C-26/C-32), 145.2 (s, C-1/C-18), 145.4 (s, C-1/C-18), 150.6 (s, C-11), 155.6 (s, C-8), 155.8 (s, C-30), 160.8 (s, C-10), 171.0 (s, C-23).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₃₉ H ₄₂ N ₆ O ₅ [M] ⁺	674.3217	674.3176

Absorptionsmax.: 395 nm

Emissionsmax.: 455 nm

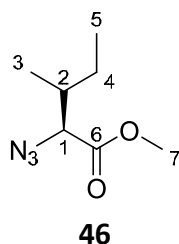
Lebenszeit: 4.0 ns

Quantenausbeute: 1.0

(S)-2-Azido-3-methyl-pentansäuremethylester (46)

Nach Herstellung des Triflylazids wurden gemäß **AAV 7** 145 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) Iso-leucinmethylester zusammen mit 207 mg (1.50 mmol, 1.50 Äq.) Kaliumcarbonat und 10 μ l (1 mol-%) einer 1 M Kupfer(II)sulfat-Lösung in 3 ml dest. Wasser und 6 ml Methanol gelöst und mit der frisch bereiteten Triflylazid-Lösung versetzt. Nach der Aufarbeitung wurden 133 mg (0.79 mmol, 79 % d. Th.) des Azids **46** ohne weitere Aufreinigung als farbloses Öl erhalten.

R_f(46) = 0.24 (EE)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 0.88–0.96 (sh, 6 H, 3-H, 5-H), 1.23 (m, 1 H, 4-H), 1.51 (m, 1 H, 4'-H) 1.95 (m, 1 H, 2-H), 3.73 (s, 3 H, 7-H), 3.78 (bs, 1 H, 1-H).

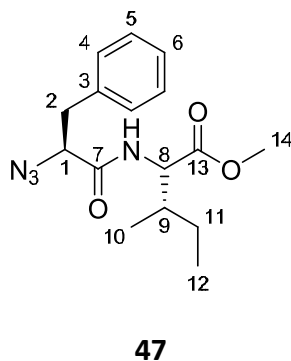
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 11.5 (q, C-5), 15.8 (q, C-3), 25.0 (t, C-4), 37.1 (d, C-2), 51.8 (q, C-7), 67.2 (d, C-1), 170.7 (s, C-6).

(S,S)-2-(2-Azido-3-phenyl-propionylamino)-3-methyl-pentansäuremethylester (47)

Nach Herstellung des Triflylazids wurden gemäß **AAV 7** 292 mg (1.00 mmol, 1.00 Äq.) Phenylalanyl-Isoleucinmethylester zusammen mit 207 mg (1.50 mmol, 1.50 Äq.) Kaliumcarbonat und 10 μ l (1 mol-%) einer 1 M Kupfer(II)sulfat-Lösung in 3 ml dest. Wasser und 6 ml Methanol gelöst und mit der frisch bereiteten Triflylazid-Lösung versetzt. Nach der Aufarbeitung wurden 299 mg (0.94 mmol, 94 % d. Th.) des Azids **47** ohne weitere Aufreinigung als farbloses Öl erhalten.

R_f(47) = 0.24 (EE)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 0.69 (d, ³J_{10,9} = 6.9 Hz, 3 H, 10-H), 0.81 (t, ³J_{12,11} = 7.4 Hz, 3 H, 12-H), 0.98 (m, 1 H, 11-H), 1.25 (m, 1 H, 11'-H), 1.71 (m, 1 H, 9-H), 2.99 (dd, ²J_{2,2'} = 14.1 Hz, ³J_{2,1} = 7.8 Hz, 1 H, 2-H), 2.26 (dd, ²J_{2',2} = 14.1 Hz, ³J_{2',1} = 4.1 Hz, 1 H, 2'-H), 3.66 (s, 3 H, 14-H), 4.18 (dd, ³J_{1,2} = 7.8 Hz, ³J_{1,2'} = 4.1 Hz, 1 H, 1-H), 4.44 (dd, ³J_{8,NH} = 8.7 Hz, ³J_{8,9} = 5.0 Hz, 1 H, 8-H), 6.66 (d, ³J_{NH,8} = 8.4 Hz, 1 H, NH), 7.18–7.24 (sh, 5 H, 4-H, 5-H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 11.5 (q, C-12), 15.2 (q, C-10), 25.0 (t, C-11), 37.7 (d, C-9), 38.4 (t, C-2), 52.2 (q, C-14), 56.4 (d, C-8), 65.4 (d, C-1), 127.2 (d, C-4/C-5/C-6), 128.6 (d, C-4/C-5/C-6), 129.6 (d, C-4/C-5/C-6), 135.9 (s, C-3), 168.1 (s, C-13), 171.8 (s, C-7).

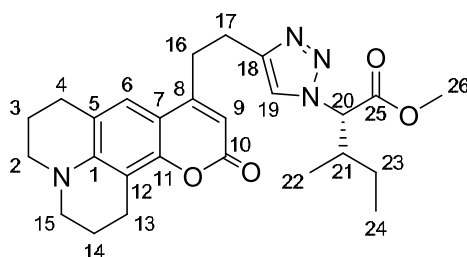
Keine Diastereomere sichtbar.

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₆ H ₂₃ N ₄ O ₃ [M+H] ⁺	319.1770	319.1784

(S)-3-Methyl-2-{4-[2-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-yl)-ethyl]-[1,2,3]triazol-1-yl}-pentansäuremethylester (48)

Analog **AAV 6** wurden 51 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des „Isoleucinmethylester“-Azids **46** und 132 mg (0.45 mmol, 1.50 Äq.) des fluoreszierenden Alkins **36** in einer 3:1 Mischung aus DMSO und dest. Wasser (8 ml) zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3, 1:1) wurden 108 mg (0.23 mmol, 77 % d. Th.) eines gelb-braunen, zähen Öls **48** erhalten.

R_f(48) = 0.21 (PE:EE 1:1)



48

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ = 0.77 (d, ³J_{24,23} = 7.4 Hz, 3 H, 24-H), 0.88 (t, ³J_{22,21} = 6.8 Hz, 3 H, 22-H), 0.95 (m, 1 H, 23-H), 1.08 (m, 1 H, 23'-H), 1.86–1.89 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.27 (m, 1 H, 21-H), 2.68–2.74 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 2.97–3.03 (sh, 4 H, 16-H, 17-H), 3.20–3.24 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.69 (s, 3 H, 26-H), 5.23 (d, ³J_{20,21} = 8.7 Hz, 1 H, 20-H), 5.75 (s, 1 H, 9-H), 7.15 (s, 1 H, 6-H), 8.01 (s, 1 H, 19-H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ = 10.5 (q, C-24), 15.1 (q, C-22), 20.0 (t, C-13), 20.1 (t, C-3/C-14), 20.9 (t, C-3/C-14), 24.2 (t, C-16), 24.4 (t, C-23), 27.0 (t, C-4), 30.3 (t, C-17), 36.6 (d, C-21), 42.0 (t, C-21), 48.6 (t, C-2/C-15), 49.1 (t, C-2/C-15), 52.5 (q, C-26), 66.5 (d, C-20), 105.6 (d, C-9), 106.4 (s, C-7/C-12), 107.0 (s, C-7/C-12), 117.7 (s, C-5), 121.6 (d, C-6), 122.2 (d, C-19), 145.4 (s, C-1/C-18), 145.5 (s, C-1/C-18), 150.6 (s, C-11), 155.7 (s, C-8), 160.7 (s, C-10), 168.8 (s, C-25).

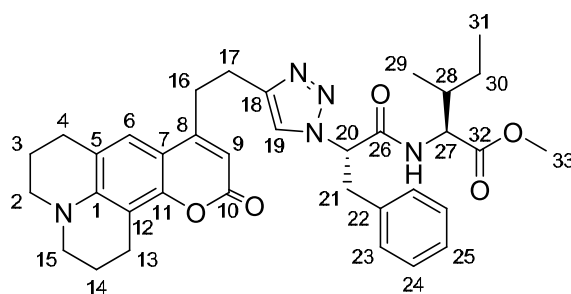
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₆ H ₃₂ N ₄ O ₄ [M] ⁺	464.2424	464.2430

Absorptionsmax.:	396 nm
Emissionsmax.:	455 nm
Lebenszeit:	4.0 ns
Quantenausbeute:	1.0

(*S,S*)-3-Methyl-2-{4-[2-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8-yl)-ethyl]-[1,2,3]triazol-1-yl}-3-phenyl-propionylamino)-pentansäuremethylester (49)

Analog **AAV 6** wurden 96 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des Dipeptidazids **47** und 132 mg (0.45 mmol, 1.50 Äq.) des fluoreszierenden Alkins **36** in einer 3:1 Mischung aus DMSO und dest. Wasser (8 ml) zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3, DCM:MeOH 98:2) wurden 138 mg (0.23 mmol, 75 % d. Th.) eines gelb-braunen, zähen Öls **49** erhalten.

$R_f(\mathbf{49}) = 0.15$ (PE:EE1:1)



49

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆):

$\delta = 0.75\text{--}0.80$ (sh, 6 H, 29-H, 31-H), 1.06 (m, 1 H, 30-H), 1.29 (m, 1 H, 30'-H), 1.77 (m, 1 H, 28-H), 1.86–1.91 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.69 (t, $^3J_{4,3} = 6.4$ Hz, 2 H, 4-H), 2.77 (t, $^3J_{13,14} = 6.4$ Hz, 2 H, 13-H), 2.91–2.98 (sh, 4 H, 16-H, 17-H), 3.14–3.19 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.26 (dd, $^2J_{21,21'} = 14.0$ Hz, $^3J_{21,20'} = 9.2$ Hz, 1 H, 21-H), 3.44 (dd, $^2J_{21',21} = 14.0$ Hz, $^3J_{21,20} = 6.1$ Hz, 1 H, 21'-H), 3.60 (s, 3 H, 33-H), 4.39 (dd, $^3J_{27,NH} = 8.2$ Hz, $^3J_{27,29} = 5.4$ Hz, 1 H, 27-H), 5.57 (dd, $^3J_{20,21} = 9.0$ Hz, $^3J_{20,21'} = 6.3$ Hz, 1 H, 20-H), 5.79 (s, 1 H, 9-H), 6.97–7.14 (sh, 6 H, 6-H, 23-H, 24-H, 25-H), 7.56 (s, 1 H, 19-H), 7.70 (d, $^3J_{NH,27} = 8.2$ Hz, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆):

$\delta = 11.1$ (q, C-31), 15.3 (q, C-29), 20.0 (t, C-13), 20.1 (t, C-3/C-14), 21.0 (t, C-3/C-14), 24.0 (t, C-16), 24.7 (t, C-30), 27.0 (t, C-4), 30.3 (t, C-17), 36.3 (d, C-28), 37.5 (t, C-21), 48.6 (t, C-2/C-15), 49.2 (t, C-2/C-15), 51.8 (t, C-33), 56.6 (d, C-27), 63.2 (d, C-20), 105.7 (d, C-9), 106.2 (s, C-7/C-12), 107.1 (s, C-7/C-12), 117.8 (s, C-5), 121.6 (d, C-6), 121.7 (d, C-19), 126.7 (d, C-25), 128.2 (d, C-23/C-24), 128.9 (d, C-25), 136.0 (s, C-22), 145.3 (s, C-1/C-18), 145.5 (s, C-1/C-18), 150.7 (s, C-11), 155.7 (s, C-8), 160.9 (s, C-10), 167.9 (s, C-32), 171.4 (s, C-26).

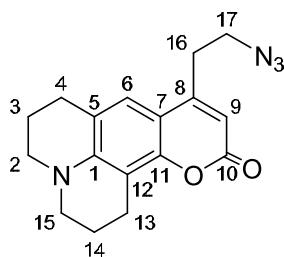
Keine Diastereomere sichtbar.

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$C_{35}H_{41}N_5O_5 [M]^+$	611.3108	611.3091
Absorptionsmax.:	392 nm	
Emissionsmax.:	454 nm	
Lebenszeit:	3.8 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

8-(2-Azido-ethyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]-anthracen-10-on (50)

Nach Herstellung des Triflylazids wurden gemäß **AAV 7** 33 mg (1.87 mmol, 1.00 Äq.) des Aminocumarins **15** zusammen mit 388 mg (2.81 mmol, 1.50 Äq.) Kaliumcarbonat und 20 μ l (1 mol-%) einer 1 M Kupfer(II)sulfat-Lösung in 6 ml dest. Wasser und 12 ml Methanol gelöst und mit der frisch bereiteten Triflylazid-Lösung versetzt. Nach der Aufarbeitung wurden 169 mg (0.94 mmol, 29 % d. Th.) des Azids **50** ohne weitere Aufreinigung als gelbes, zähes Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{50}) = 0.21$ (PE:EE 7:3)



50

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

$\delta = 1.93\text{--}2.00$ (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.77 (t, $^3J_{4,3} = 6.3$ Hz, 2 H, 4-H), 2.85–2.93 (sh, 4 H, 13-H, 16-H), 3.23–3.28 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.58 (t, $^3J_{17,16} = 7.3$ Hz, 2 H, 17-H), 5.92 (s, 1 H, 9-H), 6.95 (s, 1 H, 6-H).

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

$\delta = 20.4$ (t, C-13), 20.5 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 31.0 (t, C-16), 49.4 (t, C-2/C-15/C-17), 49.9 (t, C-2/C-15/C-17), 49.9 (t, C-2/C-15/C-17), 107.0 (d, C-9), 107.5 (s, C-7/C-12), 107.8 (s, C-7/C-12), 118.2 (s, C-5), 121.0 (d, C-6), 146.0 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 152.4 (s, C-8), 162.3 (s, C-10).

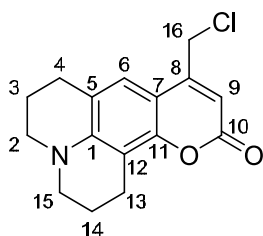
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$C_{17}H_{18}N_4O_2 [M]^+$	310.1430	310.1437
Absorptionsmax.:	393 nm	

Emissionsmax.:	500 nm
Lebenszeit:	4.1 ns
Quantenausbeute:	1.0

8-Chloromethyl-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-10-on (51)

Gemäß **AAV 4** wurden 6.27 g (33.2 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodin **12** mit 5.00 g (33.2 mmol, 1.00 Äq.) des Methyl-4-chloroacetoacetat in Gegenwart von 66 ml (66.00 mmol, 2.00 Äq.) Ti(OiPr)₃Cl (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3) wurden 6.83 g (23.6 mmol, 71 % d. Th.) eines gelborangenen Feststoffs **51** erhalten.

R_f(51) = 0.34 (PE:EE 7:3)



51

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.95–1.99 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.79 (t, ³J_{4,3} = 6.5 Hz, 2 H, 4-H), 2.88 (t, ³J_{13,14} = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.24–3.29 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.54 (s, 2 H, 16-H), 6.13 (s, 1 H, 9-H), 7.02 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.5 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 41.6 (t, C-16), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 106.0 (d, C-9), 107.0 (s, C-7/C-12), 108.3 (s, C-7/C-12), 118.3 (s, C-5), 121.1 (d, C-6), 146.1 (s, C-1), 150.0 (s, C-11), 151.5 (s, C-8), 162.1 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₆ H ₁₆ ClNO ₂ [M] ⁺	289.0870	289.0888

Schmelzpunkt: 188–190 °C

Absorptionsmax.: 406 nm

Emissionsmax.: 461 nm

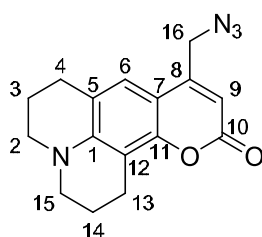
Lebenszeit: 4.2 ns

Quantenausbeute: 1.1

8-Azidomethyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on (52)

Das 4-Chloromethylcumarin **51** (1.14 g, 3.92 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einem Rundkolben in 250 ml Aceton gelöst. Zu dieser Lösung wurden 306 mg (4.70 mmol, 1.20 Äq.) Natriumazid gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Da die Reaktion nicht vollständig war, wurden erneut 306 mg (4.70 mmol, 1.20 Äq.) Natriumazid zugegeben und über Nacht bei 35 °C gerührt. Dem Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entzogen und nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 9:1, 8:2) wurden 1.05 g (3.54 mmol, 91 % d. Th.) eines orangefarbenen Feststoffs **52** erhalten.

$R_f(\mathbf{52}) = 0.32$ (PE:EE 7:3)

**52**

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

$\delta = 1.94\text{--}2.00$ (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.77 (t, $^3J_{4,3} = 6.3$ Hz, 2 H, 4-H), 2.89 (t, $^3J_{13,14} = 6.3$ Hz, 2 H, 13-H), 3.24–3.29 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.40 (s, 2 H, 16-H), 6.09 (s, 1 H, 9-H), 6.92 (s, 1 H, 6-H).

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

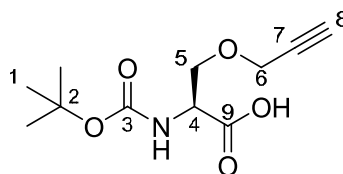
$\delta = 20.4$ (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 51.0 (t, C-16), 106.1 (d, C-9), 107.0 (s, C-7/C-12), 107.8 (s, C-7/C-12), 118.3 (s, C-5), 120.9 (d, C-6), 146.1 (s, C-1), 148.7 (s, C-11), 151.5 (s, C-8), 162.0 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$ [M] ⁺	296.1273	296.1294
Schmelzpunkt:	148–152 °C	
Absorptionsmax.:	398 nm	
Emissionsmax.:	471 nm	
Lebenszeit:	3.9 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

(S)-2-(tert-Butoxycarbonylamino)-3-(prop-2-inyloxy)propionsäure (53)^[178]

Zu einer Lösung aus 5.00 g (24.4 mmol, 1.00 Äq.) *N*-Boc-L-Serin in 37 ml DMF wurden bei 0 °C vorsichtig 2.16 g (53.7 mmol, 2.20 Äq.) Natriumhydrid (60 % in Mineralöl) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei 0 °C gerührt bis die Wasserstoffentwicklung nachgelassen hatte. Anschließend wurden 3.00 ml (3.99 g, 26.8 mmol, 1.10 Äq.) Propargylbromid zugespritzt. Das Eisbad wurde entfernt, die Reaktionsmischung drei Stunden bei RT gerührt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in dest. H₂O gelöst und dreimal mit Diethylether extrahiert. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit konz. HCl auf pH 2 wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, PE:EE:HOAc 1:1:0.01) gereinigt. Aus der Reaktion gingen 4.15 g (17.1 mmol, 70 % d. Th.) eines gelben, zähen Öls **53** hervor.

$R_f(\mathbf{53}) = 0.54$ (PE:EE 1:1)



53

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

$\delta = 1.44$ (s, 9 H, 1-H), 2.46 (t, ⁴ $J_{8,6} = 2.3$ Hz, 1 H, 8-H), 3.80 (dd, ² $J_{5,5'} = 9.3$ Hz, ³ $J_{5,4} = 3.4$ Hz, 1 H, 5-H), 3.98 (dd, ² $J_{5',5} = 9.3$ Hz, ³ $J_{5',4} = 2.4$ Hz, 1 H, 5'-H), 4.17 (d, ⁴ $J_{6,8} = 2.3$ Hz, 2 H, 6-H), 4.48 (m, 1 H, 4-H), 5.41 (d, ³ $J_{NH,4} = 8.4$ Hz, 1 H, NH), 10.03 (bs, 1 H, COOH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

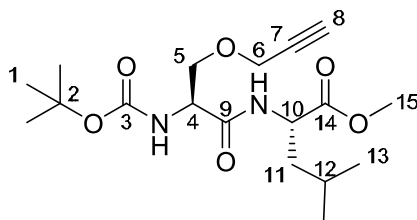
$\delta = 28.3$ (q, C-1), 53.7 (d, C-4), 58.7 (t, C-6), 69.5 (t, C-5), 75.3 (d, C-8), 78.7 (s, C-2), 80.4 (s, C-7), 155.7 (s, C-3), 175.1 (s, C-9).

(S)-2-((S)-2-tert-Butoxycarbonylamino)-3-(prop-2-inyloxypropionylamido)-4-methylpenatansäuremethylester (54)

Zu einer Lösung aus 2.50 g (10.3 mmol, 1.00 Äq.) 2-(tert-Butoxycarbonylamino)-3-(prop-2-inyloxypropionsäure **53**, 1.50 g (10.3 mmol, 1.00 Äq.) L-Leucinmethylester, 5.4 ml (3.99 g, 30.9 mmol, 3.00 Äq.) DIPEA in 150 ml Ethylacetat wurden bei 0 °C 9.2 ml (4.93 g, 15.5 mmol, 1.50 Äq.) T3P-Lösung (50 % in EE) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit ges. Natriumchlorid-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCl und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulen-

chromatographisch (Kieselgel, PE:EE 7:3) gereinigt. Aus der Reaktion gingen 3.42 g (9.23 mmol, 90 % d. Th.) eines farblosen, zähen Öls **54** als Produkt hervor.

$R_f(\mathbf{54}) = 0.37$ (PE:EE 7:3)



54

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

$\delta = 0.91$ (d, $^3J_{13,12} = 6.5$ Hz, 6 H, 13-H), 1.43 (s, 9 H, 1-H), 1.52–1.64 (sh, 3 H, 11-H, 12-H), 2.44 (t, $^4J_{8,6} = 1.4$ Hz, 1 H, 8-H), 3.63 (dd, $^2J_{5,5'} = 9.3$ Hz, $^3J_{5,4} = 6.4$ Hz, 1 H, 5-H), 3.70 (s, 3 H, 15-H), 3.90 (dd, $^2J_{5',5} = 9.3$ Hz, $^3J_{5',4} = 4.0$ Hz, 1 H, 5'-H), 4.16 (d, 2 H, 6-H), 4.28 (bs, 1 H, 10-H), 4.60 (m, 1 H, 4-H), 5.39 (d, $^3J_{\text{NH-Ser},4} = 8.7$ Hz, 1 H, NH-Ser), 6.85 (bs, 1 H, NH-Ile).

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

$\delta = 21.9$ (q, C-13/C-14), 22.8 (q, C-13/C-14), 24.7 (d, C-12), 28.2 (q, C-1), 41.5 (t, C-11), 50.6 (d, C-10), 52.2 (q, C-15), 53.6 (d, C-4), 58.6 (t, C-6), 69.3 (t, C-5), 75.1 (d, C-8), 78.8 (s, C-7), 80.3 (s, C-2), 155.4 (s, C-3), 169.9 (s, C-14), 172.9 (s, C-9).

Elementaranalyse:

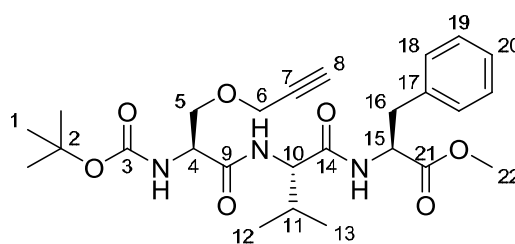
$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$	Ber.	C 58.36	H 8.16	N 7.56
(370.44)	Gef.	C 57.86	H 7.68	N 7.29

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	371.2182	371.2215

(S)-2-[(S)-2-((S)-2-tert-Butoxycarbonylamino)-3-prop-2-inyloxypropionylamino)-3-methyl-butrylamino]-3-phenyl-propionsäuremethylester (55**)**

Zu einer Lösung aus 1.24 g (5.10 mmol, 1.00 Äq.) 2-(tert-Butoxycarbonylamino-3-prop-2-inyloxypropionsäure **53**, 1.42 g (5.10 mmol, 1.00 Äq.) Valyl-Phenylalaninmethylester, 2.7 ml (1.98 g, 15.3 mmol, 3.00 Äq.) DIPEA in 45 ml Ethylacetat wurden bei 0 °C 4.6 ml (2.43 g, 7.65 mmol, 1.50 Äq.) T3P-Lösung (50 % in EE) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit ges. Natriumchlorid-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCl und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, PE:EE 7:3, 6:4) gereinigt. Aus der Reaktion gingen 1.95 g (3.87 mmol, 76 % d. Th.) eines farblosen Feststoffs **55** als Produkt hervor.

$R_f(\mathbf{55}) = 0.17$ (PE:EE 7:3)



55

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

$\delta = 0.84$ und 0.90 (2d, $^3J_{12/13,11} = 6.8$ Hz, 6 H, 12-H, 13-H), 1.44 (s, 9 H, 1-H), 2.15 (m, 1 H, 11-H), 2.46 (t, $^4J_{8,6} = 2.3$ Hz, 1 H, 8-H), 3.06 (dd, $^2J_{16,16'} = 13.9$ Hz, $^3J_{16,15} = 6.4$ Hz, 1 H, 16-H), 3.06 (dd, $^2J_{16',16} = 13.9$ Hz, $^3J_{16',15} = 6.0$ Hz, 1 H, 16'-H), 3.63 (dd, $^2J_{5,5'} = 9.3$ Hz, $^3J_{5,4} = 6.4$ Hz, 1 H, 5-H), 3.69 (s, 3 H, 22-H), 3.89 (dd, $^2J_{5',5} = 9.3$ Hz, $^3J_{5',4} = 4.3$ Hz, 1 H, 5'-H), 4.10 (d, $^4J_{6,8} = 2.3$ Hz, 2 H, 6-H), 4.25 – 4.30 (sh, 2 H, 4-H, 10-H), 4.84 (bs, 1 H, 15-H), 5.40 (bs, 1 H, NH-Ser), 6.55 (bs, 1 H, NH-Phe), 6.83 (d, $^3J_{\text{NH-Val},10} = 8.6$ Hz, 1 H, NH-Val), 7.08 – 7.29 (sh, 5 H, 18-H, 19-H, 20-H).

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

$\delta = 17.6$ (q, C-12/C-13), 19.1 (q, C-12/C-13), 28.2 (q, C-1), 30.5 (d, C-11), 37.8 (t, C-16), 52.2 (q, C-22), 53.2 (d, C-15), 54.0 (d, C-4), 58.5 (t/d, C-6/C-10), 58.6 (t/d, C-6/C-10), 69.4 (t, C-5), 75.3 (d, C-8), 78.9 (s, C-7), 80.4 (s, C-2), 127.1 (d, C-20), 128.6 (d, C-18/C-19), 129.2 (d, C-18/C-19), 135.7 (s, C-17), 155.5 (s, C-3), 170.0 (s, C-21), 170.3 (s, C-14), 171.6 (s, C-9).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7$	Ber.	C 62.01	H 7.41	N 8.34
(503.59)	Gef.	C 62.08	H 7.28	N 8.21

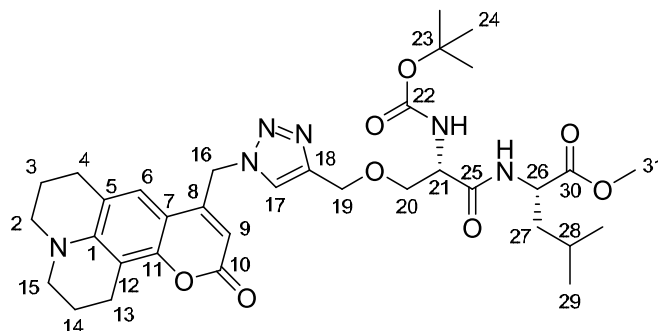
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	504.2710	504.2713

Schmelzpunkt: 87–90 °C

(S)-2-((S)-2-tert-Butoxycarbonylamino-3-{1-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-ylmethyl)-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethoxy}-propionylamino)-4-methyl-pentansäuremethylester (56)

Analog **AAV 6** wurden 116 mg (0.39 mmol, 1.30 Äq.) des Fluoreszenzazids **52** und 111 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des Dipetidalkins **54** in einer 3:1 Mischung aus DMSO und dest. Wasser (8 ml) zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 7:3 → EE) wurden 168 mg (0.25 mmol, 84 % d. Th.) eines gelb-braunen, zähen Öls **56** erhalten.

$R_f(\mathbf{56}) = 0.27$ (EE)



56

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

δ = 0.85 (d, $^3J_{29,28}$ = 6.5 Hz, 6 H, 29-H), 1.36 (s, 9 H, 24-H), 1.46–1.62 (sh, 3 H, 27-H, 28-H), 1.87–1.91 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.70–2.73 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 3.23–3.28 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.51–3.64 (sh, 5 H, 16-H, 31-H), 4.21 (m, 1 H, 21-H), 4.29 (m, 1 H, 26-H), 4.56 (bs, 2 H, 20-H), 5.33 (s, 1 H, 9-H), 5.79 (s, 2 H, 19-H), 6.67 (d, $^3J_{\text{NH-Ser},21}$ = 8.2 Hz, 1 H, NH-Ser), 7.02 (s, 1 H, 6-H), 7.94 (s, 1 H, 17-H), 8.20 (d, $^3J_{\text{NH-Ile},26}$ = 7.7 Hz, NH-Ile).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

δ = 19.8 (q, C-29/30), 19.9 (q, C-29/30), 20.8 (t, C-13), 21.1 (t, C-3/C-14), 22.7 (t, C-3/C-14), 23.9 (d, C-28), 27.0 (t, C-4), 28.0 (q, C-24), C-27 unter DMSO, 48.6 (t, C-2/C-15), 49.0 (t, C-19), 49.1 (t, C-2/C-15), 50.1 (d, C-26), 51.7 (q, C-31), 54.1 (d, C-21), 63.5 (t, C-20), 69.7 (t, C-16), 78.1 (s, C-23), 105.2 (d, C-9), 105.3 (s, C-7/C-12), 105.6 (s, C-7/C-12), 117.9 (s, C-5), 121.3 (d, C-6), 124.7 (s, C-18), 144.2 (d, C-17), 145.9 (s, C-1), 150.3 (s, C-11/C-22), 150.6 (s, C-11/C-22), 155.0 (s, C-8), 160.4 (s, C-10), 169.9 (s, C-30), 172.6 (s, C-25).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₃₄ H ₄₆ N ₆ O ₈ [M] ⁺	666.3377	666.3375

Absorptionsmax.: 394 nm

Emissionsmax.: 480 nm

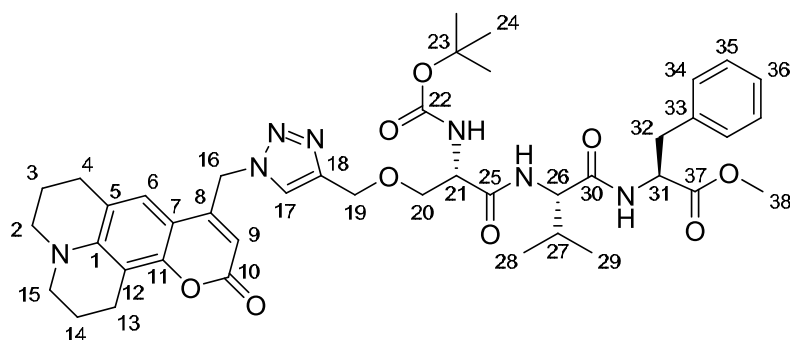
Lebenszeit: 4.8 ns

Quantenausbeute: 1.2

(S)-2-[(S)-2-((S)-2-tert-Butoxycarbonylamino-3-{1-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-ylmethyl)-1H-[1,2,3]triazol-4-ylmethoxy}-propionylamino)-3-methyl-butrylamino]-3-phenyl-propionsäuremethylester (57)

Anaolg **AAV 6** wurden 116 mg (0.39 mmol, 1.30 Äq.) des Fluoreszenzazids **52** und 151 mg (0.30 mmol, 1.00 Äq.) des Dipetidalkins **55** in einer 3:1 Mischung aus DMSO und dest. Wasser (8 ml) zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 7:3 → EE) wurden 185 mg (0.23 mmol, 77 % d. Th.) eines gelb-braunen, zähen Öls **57** erhalten.

$R_f(57) = 0.25$ (EE)



57

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6):

$\delta = 0.74$ und 0.79 (2d, $^3J_{28/29,27} = 6.6$ Hz, 6 H, 28-H, 29-H), 1.36 (s, 9 H, 24-H), 1.88–1.94 (sh, 5 H, 3-H, 14-H, 27-H), 2.69–2.73 (sh, 4 H, 4-H, 13-H), 2.91 (dd, $^2J_{32,32'} = 13.8$ Hz, $^3J_{32,31} = 8.7$ Hz, 32-H), 2.99 (dd, $^3J_{32',32} = 13.8$ Hz, $^3J_{32,31} = 6.1$ Hz, 32'-H), 3.23–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.54–3.58 (sh, 5 H, 16-H, 38-H), 4.17–4.23 (sh, 2 H, 21-H, 26-H), 4.45 (m, 1 H, 31-H), 4.53 (bs, 2 H, 20-H), 5.33 (s, 1 H, 9-H), 5.78 (s, 2 H, 19-H), 7.09 (d, $^3J_{\text{NH-Ser},21} = 8.2$ Hz, 1 H, NH-Ser), 7.16–7.26 (sh, 6 H, 6-H, 34-H, 35-H, 36-H), 7.57 (d, $^3J_{\text{NH-Val},26} = 8.9$ Hz, NH-Val), 8.15 (s, 1 H, 17-H), 8.45 (d, $^3J_{\text{NH-Phe},31} = 7.1$ Hz, NH-Phe).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6):

$\delta = 17.5$ (q, C-28/29), 18.8 (q, C-28/29), 19.8 (t, C-13), 19.9 (t, C-3/C-14), 20.8 (t, C-3/C-14), 27.0 (t, C-4), 28.0 (q, C-24), 48.6 (t, C-2/C-15), 49.0 (t, C-19), 49.1 (t, C-2/C-15), 51.6 (q, C-38), 53.4 (d, C-31), 54.5 (d, C-21), 56.8 (t, C-20), 63.5 (t, C-16), 78.3 (s, C-23), 105.2 (d, C-9), 105.3 (s, C-7/C-12), 105.6 (s, C-7/C-12), 117.9 (s, C-5), 121.3 (d, C-6), 124.8 (s, C-18), 126.4 (d, C-34/C-35/C-36), 128.1 (d, C-34/C-35/C-36), 128.8 (d, C-34/C-35/C-36), 136.9 (s, C-33), 144.2 (d, C-17), 145.8 (s, C-1), 150.3 (s, C-11/C-22), 150.6 (s, C-11/C-22), 155.2 (s, C-8), 160.4 (s, C-10), 169.4 (s, C-37), 170.7 (s, C-30), 171.6 (s, C-25).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_9$ [M+H] $^+$	800.3978	800.3980

Absorptionsmax.: 393 nm

Emissionsmax.: 480 nm

Lebenszeit: 4.8 ns

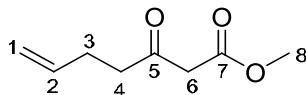
Quantenausbeute: 1.2

3-Oxo-hept-6-ensäuremethylester (58)

Gemäß **AAV 3** wurden 2.43 g (24.3 mmol, 1.00 Äq.) Pent-4-ensäure mit 4.73 g (29.2 mmol, 1.20 Äq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol zum Imidazolid aktiviert. Das Imidazolid wurde anschließend mit 5.70 g (36.5 mmol, 1.50 Äq.) Mono-methylkaliummalonat, das mit 2.40 g

(25.3 mmol, 1.04 Äq.) Magnesiumchlorid chelatisiert wurde, zur Reaktion gebracht. Nach Rühren über Nacht und säulenchromatographischer Trennung (Kieselgel, Hexan:EE 8:2) wurden 2.74 g (17.5 mmol, 72 % d. Th.) eines leicht gelben Öls **58** erhalten.

$R_f(\mathbf{58}) = 0.32$ (Hex:EE 8:2)



58

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

$\delta = 2.35$ (m, 2 H, 3-H), 2.64 (t, $^3J_{4,3} = 7.3$ Hz, 2 H, 4-H), 3.45 (s, 2 H, 6-H), 3.73 (s, 3 H, 8-H), 5.04 (m, 2 H, 1-H), 5.81 (m, 1 H, 2-H).

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

$\delta = 27.4$ (t, C-3), 42.0 (t, C-4), 49.0 (t, C-6), 52.3 (q, C-8), 115.6 (t, C-1), 136.5 (d, C-2), 167.5 (s, C-7), 201.8 (s, C-5).

Elementaranalyse:

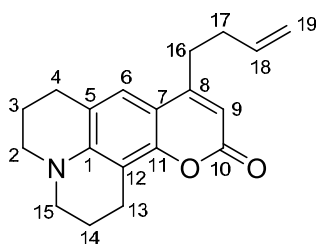
$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$	Ber.	C 61.52	H 7.74
(156.08)	Gef.	C 62.11	H 7.40

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$	156.0786	156.0795

8-(But-3-enyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-10-on (59)

Gemäß **AAV 4** wurden 1.95 g (10.3 mmol, 1.00 Äq.) des 8-Hydroxyjulodins **12** mit 1.63 g (10.3 mmol, 1.00 Äq.) des 3-Oxohept-6-ensäuremethylesters **58** in Gegenwart von 20.0 ml (20.0 mmol, 2.00 Äq.) $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_3\text{Cl}$ (1 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3) wurden 2.60 g (8.80 mmol, 85 % d. Th.) eines ockerfarbenen Feststoffs **59** erhalten.

$R_f(\mathbf{59}) = 0.52$ (Hex:EE 1:1)



59

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.94–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.41 (m, 2 H, 17-H), 2.71–2.79 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.88 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 5.07 (m, 2 H, 19-H), 5.82–5.92 (sh, 2 H, 9-H, 18-H), 6.99 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 31.0 (t, C-16), 32.5 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 107.0 (d, C-9), 107.2 (s, C-7/C-12), 108.0 (s, C-7/C-12), 115.8 (t, C-19), 117.9 (s, C-5), 121.3 (d, C-6), 136.9 (d, C-18), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 156.0 (s, C-8), 162.6 (s, C-10).

Elementaranalyse:

C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	Ber.	C 77.26	H 7.17	N 4.74
(295.38)	Gef.	C 77.02	H 7.29	N 4.57

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₉ H ₂₁ NO ₂ [M] ⁺	295.1572	295.1525

Schmelzpunkt: 99–101 °C

Absorptionsmax.: 393 nm

Emissionsmax.: 455 nm

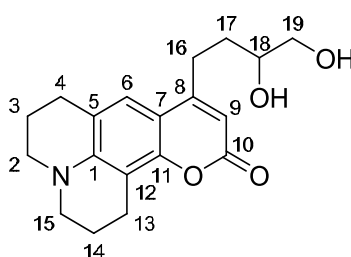
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

8-(3,4-Dihydroxy-butyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-10-on (60)

Zu einer Lösung aus 331 mg (1.12 mmol, 1.00 Äq.) des Fluoreszenzalkens **59** in THF:H₂O 2:1 (45 ml) wurden 211 mg (1.80 mmol, 1.60 Äq.) NMO und 15 mg (60 µmol, 0.05 Äq.) Osmiumtetroxid zugegeben. Die Lösung wurde für 3 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches erfolgte die Zugabe von 500 mg NaHSO₃ und ges. NaHCO₃-Lösung. Das Gemisch wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohdiol **60** (398 mg) wurde ohne weitere Reinigung in die Glykolspaltung eingesetzt.

R_f(60) = 0.00, Startfleck (DCM:EE 98:2)



60

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.75–1.78 (m, 2 H, 17-H), 1.92–1.99 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.40 (bs, 1 H, OH), 2.94–2.79 (sh, 6 H, 4-H, 16-H, 13-H), 3.21–3.26 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.51 (dd, $^3J_{19,OH} = 11.0$ Hz, $^3J_{19,18} = 7.3$ Hz, 1 H, 19-H), 3.67–3.76 (sh, 2 H, 19-H, OH), 3.77 (m, 1 H, 18-H), 5.91 (s, 1 H, 9-H), 7.04 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

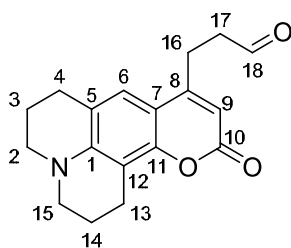
δ = 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-16), 27.8 (t, C-4), 31.8 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 66.7 (t, C-19), 71.3 (d, C-18), 106.9 (d, C-9), 108.0 (s, C-7/C-12), 117.1 (s, C-7/C-12), 118.1 (s, C-5), 121.5 (d, C-6), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 156.7 (s, C-8), 162.8 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₉ H ₂₂ NO ₄ [M-H] ⁺	328.1549	328.1529

3-(10-Oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8-yl)-propionaldehyd (**61**)

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 497 mg (1.12 mmol, 1.00 Äq.) Bleitetraacetat zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 396 mg (1.12 mmol, 1.00 Äq.) des Roh-Diols **60** in 90 ml abs. Dichlormethan gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach 15 min mit Chloroform verdünnt, sowohl mit dest. Wasser als auch mit 10 %-iger K₂CO₃-Lösung gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und der erhaltene Rückstand mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, DCM:EE 98:2) gereinigt. Die Glykolspaltung lieferte 234 mg (0.78 mmol, 70 % d. Th. über zwei Stufen) des Aldehyds **61** als gelben Feststoff.

R_f(61) = 0.08 (DCM:EE 98:2)



61

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.96–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.77 (t, $^3J_{4,3} = 6.3$ Hz, 2 H, 4-H), 2.83–2.90 (sh, 4 H, 13-H, 17-H), 2.98 (t, $^3J_{16,17} = 6.5$ Hz, 2 H, 16-H), 3.23–3.28 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 5.88 (s, 1 H, 9-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H), 9.87 (bs, 1 H, 18-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.5 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 23.6 (t, C-16), 27.8 (t, C-4), 42.3 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 107.0 (d, C-9), 107.1 (s, C-7/C-12), 107.6 (s, C-7/C-12), 118.1 (s, C-5), 121.0 (d, C-6), 145.9 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 154.7 (s, C-8), 162.3 (s, C-10), 199.9 (d, C-18).

Elementaranalyse:

$C_{18}H_{19}NO_3$ (297.35)	Ber.	C 72.71	H 6.44	N 4.71
	Gef.	C 72.84	H 6.88	N 4.58

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$C_{18}H_{19}NO_3$ [M] ⁺	297.1365	297.1398

Schmelzpunkt: 146–149 °C

Absorptionsmax.: 393 nm

Emissionsmax.: 456 nm

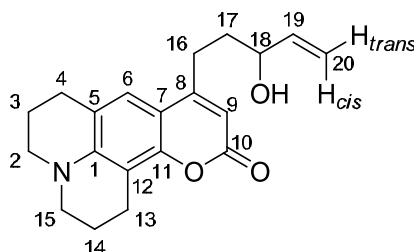
Lebenszeit: 4.1 ns

Quantenausbeute: 1.0

8-(3-Hydroxy-pent-4-enyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-10-on (62)

Bei –20 °C wurden zu einer Lösung aus 500 mg (1.68 mmol, 1.00 Äq.) des Aldehyds **61** in 20 ml abs. THF eine 1 M Vinylmagnesiumbromid-Lösung in THF (2.02 ml, 2.02 mmol) langsam zugetropft. Danach wurde das Kältebad entfernt und bis zum vollständigen Umsatz (3 h) weitergerührt. Anschließend wurde mit Dichlormethan verdünnt und bei 0 °C mit 1 M NH_4Cl -Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und anschließender säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, DCM:EE 98:2) wurden 302 mg (0.89 mmol, 54 % d. Th.) des Allylalkohols **62** als gelber Feststoff isoliert.

$R_f(\mathbf{62}) = 0.23$ (PE:EE 1:1)



62

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$):

$\delta = 1.87$ (m, 2 H, 17-H), 1.94–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.70–2.84 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.89 (t, $^3J_{13,14} = 6.5$ Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.22 (m, 1 H, 18-H), 5.18 (ddd, $^3J_{20trans,19} = 10.4$ Hz, $^2J_{20trans,20cis} = ^3J_{20trans,18} = 1.2$ Hz, 1 H, 20_{trans}-H), 5.29 (ddd, $^3J_{20cis,19} = 17.2$ Hz, $^2J_{20cis,20trans} = ^3J_{20cis,18} = 1.2$ Hz, 1 H, 20_{cis}-H), 5.88–5.96 (sh, 2 H, 9-H, 19-H), 7.04 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 27.4 (t, C-4), 27.8 (t, C-16), 35.6 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 72.3 (d, C-18), 107.0 (d, C-9), 107.1 (s, C-7/C-12), 108.0 (s, C-7/C-12), 115.5 (t, C-20), 118.0 (s, C-5), 121.5 (d, C-6), 140.5 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 156.6 (s, C-8), 162.7 (s, C-10).

Elementaranalyse:

C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	Ber.	C 73.82	H 7.12	N 4.30
(325.40)	Gef.	C 73.48	H 7.03	N 3.74

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₀ H ₂₃ NO ₃ [M] ⁺	325.1678	325.1680

Schmelzpunkt: 104–106 °C

Absorptionsmax.: 392 nm

Emissionsmax.: 454 nm

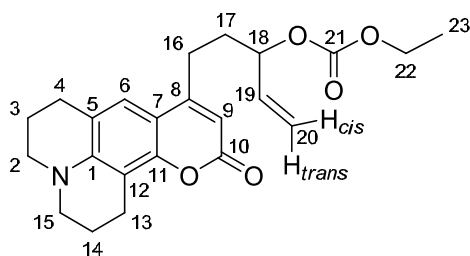
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

1-[2-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8*yl*)-ethyl]-allylethylcarbonat (63**)**

Gemäß **AAV 8** wurden 3.05 g (9.00 mmol, 1.00 Äq.) des Allylalkohols **62** in 9 ml trockenem Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 1.7 ml (1.95 g, 18.0 mmol, 2.00 Äq.) Chlorameisensäureethylester versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf RT erwärmt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3) wurden 3.04 g (7.65 mmol, 85 % d. Th.) des Allylcarbonates **63** als gelber Feststoff erhalten.

R_f(63) = 0.16 (PE:EE 7:3)



63

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.31 (t, ³J_{23,22} = 7.1 Hz, 3 H, 23-H), 1.91–2.06 (sh, 6 H, 3-H, 14-H, 17-H, 17'-H), 2.68–2.78 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.85 (t, ³J_{13,14} = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.21–3.26 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.20 (q, ³J_{22,23} = 7.1 Hz, 2 H, 22-H), 5.15 (ddd, ³J_{18,17} = ³J_{18,19} = 12.7 Hz, ³J_{18,17'} = 6.5 Hz, 1 H, 18-H), 5.28 (ddd, ³J_{20trans,19} = 10.5 Hz, ²J_{20trans,20cis} = ³J_{20trans,18} = 1.1 Hz, 1 H, 20_{trans}-H), 5.36 (ddd, ³J_{20cis,19} = 17.3 Hz,

$^2J_{20\text{cis},20\text{trans}} = ^3J_{20\text{cis},18} = 1.1 \text{ Hz}$, 1 H, 20_{cis}-H), 5.80–5.88 (sh, 2 H, 9-H, 19-H), 6.96 (s, 1 H, 6-H).

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

$\delta = 14.2$ (q, C-23), 20.4 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.0 (t, C-4), 27.7 (t, C-16), 33.0 (t, C-17), 49.4 (t, C-2/C-15), 49.8 (t, C-2/C-15), 64.0 (t, C-22), 77.8 (d, C-18), 106.9 (d, C-9), 107.0 (s, C-7/C-12), 107.7 (s, C-7/C-12), 118.0 (s, C-5), 118.2 (t, C-20), 121.2 (d, C-6), 135.2 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 154.4 (s, C-8), 155.6 (s, C-21), 162.4 (s, C-10).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$	Ber.	C 69.50	H 6.85	N 3.52
(397.46)	Gef.	C 69.60	H 6.84	N 3.40

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ [M] ⁺	397.1889	397.1905

Schmelzpunkt: 89–93 °C

Absorptionsmax.: 396 nm

Emissionsmax.: 456 nm

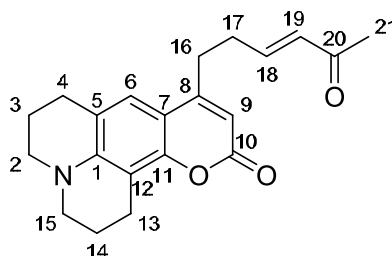
Lebenszeit: 3.9 ns

Quantenausbeute: 1.0

(E)-8-(5-Oxo-hex-3-enyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on (**64**)

2.94 g (9.22 mmol, 1.03 Äq.) 1-Triphenylphosphanyliden-2-propanon^[166] wurden in 50 ml THF suspendiert. Nach der Zugabe von 2.66 g (8.95 mmol, 1.00 Äq.) des fluoreszierenden Aldehyds **61** wurde die Reaktionsmischung 23 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, PE:EE 7:3, 6:4), wobei 2.89 g (8.57 mmol, 96 % d. Th.) des Wittig-Produktes **64** als gelber Feststoff erhalten wurden.

$R_f(\mathbf{64}) = 0.19$ (PE:EE 1:1)



64

Das Produkt zersetzt sich nach einem Tag.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.94–1.99 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.24 (s, 3 H, 21-H), 2.59 (m, 2 H, 17-H), 2.75–2.83 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.68 (t, ³*J*_{13,14} = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 5.88 (s, 1 H, 9-H), 6.13 (dt, ³*J*_{19,18} = 16.0 Hz, ⁴*J*_{19,17} = 1.4 Hz, 1 H, 19-H), 6.82 (dt, ³*J*_{18,19} = 15.9 Hz, ³*J*_{18,17} = 6.7 Hz, 1 H, 18-H), 6.95 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.5 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.0 (q, C-21), 27.8 (t, C-4), 30.0 (t, C-16), 31.0 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 107.1 (d, C-9), 107.6 (2s, C-7, C-12), 118.1 (s, C-5), 121.0 (d, C-6), 132.0 (d, C-19), 145.5 (d, C-18), 145.9 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 154.9 (s, C-8), 162.4 (s, C-10), 198.3 (s, C-20).

Elementaranalyse:

C ₂₁ H ₂₃ NO ₃	Ber.	C 74.75	H 6.87	N 4.15
(337.41)	Gef.	C 75.07	H 6.78	N 4.14

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₁ H ₂₃ NO ₃ [M] ⁺	337.1678	337.1630

Schmelzpunkt: 95–97 °C

Absorptionsmax.: 394 nm

Emissionsmax.: 456 nm

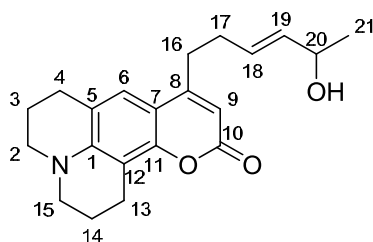
Lebenszeit: 4.0 ns

Quantenausbeute: 1.0

(E)-8-(5-Hydroxy-hex-3-enyl)-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on (65)

260 mg (0.77 mmol, 1.00 Äq.) des Wittig-Produktes **64** wurden zusammen mit 287 mg (0.77 mmol, 1.03 Äq.) CeCl₃·7 H₂O in 2 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden innerhalb von 5 min 29 mg (0.77 mmol, 1.10 Äq.) Natriumborhydrid zugegeben. Nach weiteren 5 min Rühren bei RT wurde mit 1 M KHSO₄-Lösung hydrolysiert und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, PE:EE 6:4, 1:1), wobei 206 mg (0.60 mmol, 79 % d. Th.) des Alkohols **65** als gelbes, glasartiges Öl erhalten wurde.

R_f(65) = 0.14 (PE:EE 1:1)



Die Verbindung ist instabil und zersetzt sich schnell.

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

$\delta = 1.24$ (d, $^3J_{21,20} = 6.3$ Hz, 3 H, 21-H), 1.91–1.98 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.35 (td, $^3J_{17,16} = 14.9$ Hz, $^3J_{17,18} = 6.1$ Hz, 2 H, 17-H), 2.68–2.77 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.86 (t, $^3J_{13,14} = 6.5$ Hz, 2 H, 13-H), 3.20–3.25 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.26 (qd, $^3J_{20,21} = ^3J_{20,19} = 6.3$ Hz, 1 H, 20-H), 5.57 (dd, $^3J_{19,18} = 15.4$ Hz, $^3J_{19,20} = 6.2$ Hz, 1 H, 19-H), 5.67 (dt, $^3J_{18,19} = 15.4$ Hz, $^3J_{18,17} = 6.1$ Hz, 1 H, 18-H), 5.86 (s, 1 H, 9-H), 6.96 (s, 1 H, 6-H).

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

$\delta = 20.5$ (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 23.5 (q, C-21), 27.7 (t, C-4), 31.0 (t, C-16), 31.3 (t, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 68.5 (d, C-20), 106.9 (d, C-9), 107.1 (s, C-7/C-12), 108.0 (s, C-7/C-12), 118.0 (s, C-5), 121.4 (d, C-6), 128.6 (d, C-18), 135.7 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 156.1 (s, C-8), 162.7 (s, C-10).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ [M] ⁺	339.1834	339.1822

Absorptionsmax.: 418 nm

Emissionsmax.: 454 nm

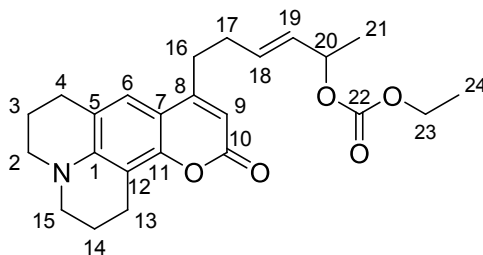
Lebenszeit: 4.0 ns

Quantenausbeute: 1.0

1-Methyl-5-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8yl)-pent-2-enyl-ethylcarbonat (66)

Gemäß **AAV 8** wurden 533 mg (1.57 mmol, 1.00 Äq.) des Allylkohols **65** in 1.6 ml trockenem Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 0.30 ml (341 mg, 3.14 mmol, 2.00 Äq.) Chlorameisensäureethylester versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf RT erwärmt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, PE:EE 7:3) wurden 556 mg (1.35 mmol, 86 % d. Th.) des Allylcarbonates **66** als gelbes, zähes Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{66}) = 0.19$ (PE:EE 7:3)



66

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.30 (t, $^3J_{24,23}$ = 7.1 Hz, 3 H, 24-H), 1.35 (d, $^3J_{21,20}$ = 6.5 Hz, 3 H, 21-H), 1.94–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.39 (td, $^3J_{17,16}$ = 15.2 Hz, $^3J_{17,18}$ = 6.4 Hz, 2 H, 17-H), 2.72 (t, $^3J_{16,17}$ = 15.2 Hz, 2 H, 16-H), 2.78 (t, $^3J_{4,3}$ = 6.3 Hz, 2 H, 4-H), 2.88 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.18 (q, $^3J_{23,24}$ = 7.1 Hz, 2 H, 23-H), 5.16 (qd, $^3J_{20,21}$ = $^3J_{20,19}$ = 6.5 Hz, 1 H, 20-H), 5.56 (ddt, $^3J_{19,18}$ = 15.4 Hz, $^3J_{19,20}$ = 6.9 Hz, $^4J_{19,17}$ = 1.3 Hz, 1 H, 19-H), 5.81 (dt, $^3J_{18,19}$ = 15.4 Hz, $^3J_{18,17}$ = 6.4 Hz, 1 H, 18-H), 5.89 (s, 1 H, 9-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 14.3 (q, C-24), 20.4 (t, C-13), 20.5 (t, C-3/C-14), 21.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (q, C-21), 27.8 (t, C-4), 31.0 (2t, C-16, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 63.8 (t, C-23), 74.8 (d, C-20), 107.0 (d, C-9), 107.2 (s, C-7/C-12), 107.9 (s, C-7/C-12), 118.0 (s, C-5), 121.3 (d, C-6), 130.4 (d, C-18), 131.8 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 154.5 (s, C-8), 155.7 (s, C-22), 162.5 (s, C-10).

Elementaranalyse:

C ₂₄ H ₂₉ NO ₅	Ber.	C 70.05	H 7.10	N 3.40
(411.49)	Gef.	C 69.71	H 7.61	N 3.13

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₄ H ₂₉ NO ₅ [M] ⁺	411.2046	411.2059

Absorptionsmax.: 418 nm

Emissionsmax.: 454 nm

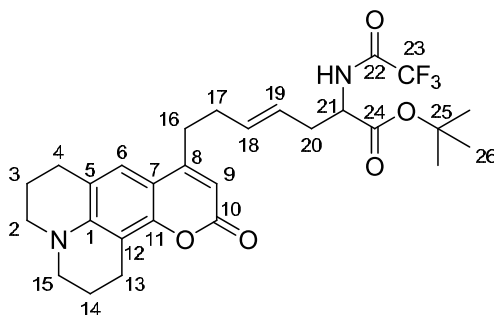
Lebenszeit: 4.0 ns

Quantenausbeute: 1.0

7-(10-Oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-yl)-2-(2,2,2-trifluoracetyl-amino)-hept-4-ensäure-*tert*-butylester (67)

Gemäß **AAV 9** wurden 64 mg (0.28 mmol, 1.10 Äq.) TFA-Glycin-*tert*-butylester mit 99 mg (0.25 mmol, 1.00 Äq.) des 7-Aminocumarin-Carbonats **63** umgesetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) wurden 65 mg (0.12 mmol, 49 % d. Th.) des unverzweigten Regioisomeren **67** als gelbes Öl erhalten.

R_f(67) = 0.20 (PE:EE 7:3)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.47 (s, 9 H, 26-H), 1.94–1.97 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.35 (td, $^3J_{17,16} = 15.1$ Hz, $^3J_{17,18} = 7.1$ Hz, 2 H, 17-H), 2.49 (m, 1 H, 20-H), 2.62–2.70 (sh, 3 H, 16-H, 20'-H), 2.76 (t, $^3J_{4,3} = 6.1$ Hz, 2 H, 4-H), 2.87 (t, $^3J_{13,14} = 6.5$ Hz, 2 H, 13-H), 3.21–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.50 (m, 1 H, 21-H), 5.34 (m, 1 H, 19-H), 5.61 (dt, $^3J_{18,19} = 15.4$ Hz, $^3J_{18,17} = 6.4$ Hz, 1 H, 18-H), 5.86 (s, 1 H, 9-H), 6.94–6.96 (sh, 2 H, 6-H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

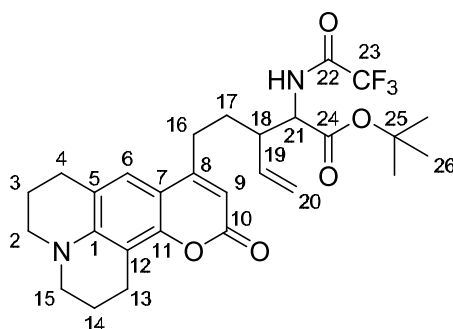
δ = 20.4 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 27.9 (q, C-26), 31.2 (2t, C-16, C-17), 35.0 (t, C-20), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 52.7 (d, C-21), 83.5 (s, C-25), 107.0 (d, C-9), 107.0 (s, C-7/C-12), 107.9 (s, C-7/C-12), C-23 nicht sichtbar, 118.0 (s, C-5), 121.2 (d, C-6), 124.0 (d, C-18), 134.1 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 155.8 (s, C-8), C-22 nicht sichtbar, 162.6 (s, C-10), 169.3 (s, C-24).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₈ H ₃₃ F ₃ N ₂ O ₅ [M] ⁺	534.2342	534.2336
Absorptionsmax.:	385 nm	
Emissionsmax.:	455 nm	
Lebenszeit:	4.0 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

3-[2-(10-Oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8yl)-ethyl]-2-(2,2,2-trifluoracetylamino)-pent-4-ensäure-tert-butylester (68)

Gemäß **AAV 9** wurde 64 mg (0.28 mmol, 1.10 Äq.) TFA-Glycin-*tert*-butylester mit 103 mg (0.25 mmol, 1.00 Äq.) des 7-Aminocumarin-Carbonats **63** umgesetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) wurden 44 mg (0.08 mmol, 33 % d. Th., dr 70:30) des verzweigten Regioisomeren **68** als gelbes Öl erhalten.

R_f(68) = 0.20 (PE:EE 7:3)



68

Hauptdiastereomer *anti* (70 %):**¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):**

δ = 1.47 (s, 9 H, 26-H), 1.95–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.35 (td, $^3J_{17,16} = 15.1$ Hz, $^3J_{17,18} = 7.1$ Hz, 2 H, 17-H), 2.68–2.78 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.85 (t, $^3J_{13,14} = 6.5$ Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.20 (m, 1 H, 18-H) 4.61 (m, 1 H, 21-H), 5.28 (sh, 2 H, 20-H_{cis}, 20-H_{trans}), 5.60 (m, 1 H, 19-H), 5.86 (s, 1 H, 9-H), 6.95 (s, 1 H, 9-H), 6.77 (d, $^3J_{\text{NH},21} = 7.9$ Hz, 1 H, NH), 6.95 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.4 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.5 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 27.9 (q, C-26), 31.2 (2t, C-16, C-17), 46.3 (d, C-18), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 55.4 (d, C-21), 83.6 (s, C-25), 107.1 (d, C-9), 107.2 (s, C-7/C-12), 107.9 (s, C-7/C-12), C-23 nicht sichtbar, 118.0 (t, C-20), 120.1 (s, C-5), 123.2 (d, C-6), 132.7 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.2 (s, C-11), 155.7 (s, C-8), C-22 nicht sichtbar, 162.5 (s, C-10), 168.6 (s, C-24).

Nebendiastereomer *syn* (30 %, ausgewählte Signale):**¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):**

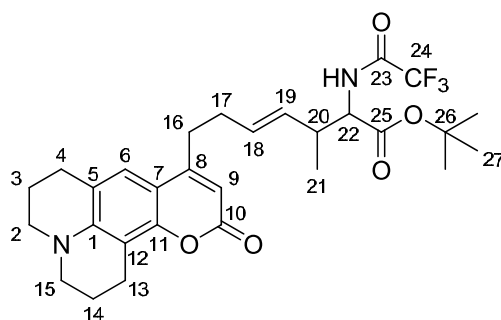
δ = 1.46 (s, 9 H, 26-H), 6.96 (s, 1 H, 6-H).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₈ H ₃₃ F ₃ N ₂ O ₅ [M] ⁺	534.2342	534.2336
Absorptionsmax.:	385 nm	
Emissionsmax.:	455 nm	
Lebenszeit:	4.0 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

3-Methyl-7-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8yl)-2-(2,2,2-trifluoracetylamino)-hept-4-ensäure-*tert*-butylester (69)

Gemäß **AAV 9** wurde 64 mg (0.28 mmol, 1.10 Äq.) TFA-Glycin-*tert*-butylester mit 103 mg (0.25 mmol, 1.00 Äq.) des 7-Aminocumarin-Carbonats **66** umgesetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) wurden ausschließlich 88 mg (0.16 mmol, 64 % d. Th., dr 70:30) des Regioisomeren **69** als gelbes Öl erhalten.

R_f(69) = 0.30 (PE:EE 7:3)



69

Hauptdiastereomer *anti* (70 %):**¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):**

δ = 1.06 (d, $^3J_{21,20}$ = 7.0 Hz, 3 H, 21-H), 1.47 (s, 9 H, 27-H), 1.95–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.36 (td, $^3J_{17,16}$ = 14.2 Hz, $^3J_{17,18}$ = 6.6 Hz, 2 H, 17-H) 2.66–2.78 (sh, 5 H, 4-H, 16-H, 20-H), 2.87 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.44 (dd, $^3J_{22,NH}$ = 8.2 Hz, $^3J_{22,20}$ = 5.1 Hz, 1 H, 22-H), 5.34 (m, 1 H, 19-H), 5.81 (m, 1 H, 18-H), 5.86 (s, 1 H, 9-H), 6.74 (d, $^3J_{NH,22}$ = 8.2 Hz, 1 H, NH), 6.95 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 16.5 (q, C-21), 20.5 (t, C-13), 20.6 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 28.0 (q, C-27), 31.3 (2t, C-16, C-17), 39.8 (d, C-20), 49.4 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 57.1 (d, C-22), 83.3 (s, C-26), 106.9 (d, C-9), 107.0 (s, C-7/C-12), 107.8 (s, C-7/C-12), 117.9 (s, C-5), 121.2 (d, C-6), 130.3 (d, C-18), 131.4 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 155.7 (s, C-8), 155.8 (s, C-23), 162.5 (s, C-10), 169.0 (s, C-25).

Nebendiastereomer *syn* (30 %, ausgewählte Signale):**¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):**

δ = 1.06 (d, $^3J_{21,20}$ = 7.0 Hz, 3 H, 21-H), 1.47 (s, 9 H, 27-H), 1.95–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.36 (td, $^3J_{17,16}$ = 14.2 Hz, $^3J_{17,18}$ = 6.6 Hz, 2 H, 17-H) 2.66–2.78 (sh, 5 H, 4-H, 16-H, 20-H), 2.87 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 4.44 (dd, $^3J_{22,NH}$ = 8.2 Hz, $^3J_{22,20}$ = 5.1 Hz, 1 H, 22-H), 5.34 (m, 1 H, 19-H), 5.81 (m, 1 H, 18-H), 5.86 (s, 1 H, 9-H), 6.74 (d, $^3J_{NH,22}$ = 8.2 Hz, 1 H, NH), 6.95 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

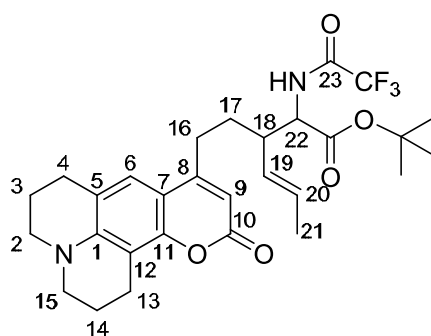
δ = 15.4 (q, C-21), 39.5 (d, C-20), 56.7 (d, C-22), 83.4 (s, C-26), 107.8 (s, C-7/C-12), 121.3 (s, C-6), 130.7 (d, C-18), 130.8 (d, C-19), 168.8 (s, C-25).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₉ H ₃₅ F ₃ N ₂ O ₅ [M] ⁺	548.2498	548.2495
Absorptionsmax.:	388 nm	
Emissionsmax.:	455 nm	
Lebenszeit:	4.0 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

3-[2-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8*yl*)-ethyl]-2-(2,2,2-trifluoracetyl-amino)-hex-4-ensäure-*tert*-butylester (**70**)

Gemäß **AAV 9** wurde 64 mg (0.28 mmol, 1.10 Äq.) TFA-Glycin-*tert*-butylester mit 103 mg (0.25 mmol, 1.00 Äq.) des 7-Aminocumarin-Carbonats **66** umgesetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) wurden ausschließlich 29 mg (0.05 mmol, 21 % d. Th.) des Regioisomeren **70** als gelbes Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{70}) = 0.30$ (PE:EE 7:3)



70

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

$\delta = 1.47$ (s, 9 H, 27-H), 1.72 (bs, 3 H, 21-H), 1.95–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.36 (td, $^3J_{17,16} = 14.2$ Hz, $^3J_{17,18} = 6.6$ Hz, 2 H, 17-H) 2.66–2.78 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.87 (t, $^3J_{13,14} = 6.5$ Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.90 (m, 1 H, 18-H), 4.49 (m, 1 H, 22-H), 5.34 (m, 1 H, 19-H), 5.81 (m, 1 H, 20-H), 5.86 (s, 1 H, 9-H), 6.74 (d, $^3J_{\text{NH},22} = 8.2$ Hz, 1 H, NH), 6.95 (s, 1 H, 6-H).

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

$\delta = 18.0$ (q, C-21), 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 22.4 (t, C-3/C-14), 27.7 (t, C-4), 28.4 (q, C-27), 29.7 (2t, C-17, C-16), 45.4 (d, C-18), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 57.1 (d, C-22), 83.3 (s, C-26), 107.2 (d, C-9), 107.9 (s, C-7/C-12), 109.9 (s, C-7/C-12), 117.2 (s, C-5), 121.2 (d, C-6), 127.5 (d, C-20), 128.4 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 155.7 (s, C-8), 157.0 (s, C-23), 162.5 (s, C-10), 169.0 (s, C-25).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$ [M] ⁺	548.2498	548.2495

Absorptionsmax.: 388 nm

Emissionsmax.: 455 nm

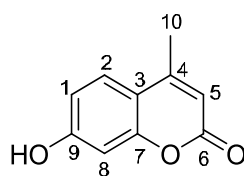
Lebenszeit: 4.0 ns

Quantenausbeute: 1.0

7-Hydroxy-4-methylcumarin (71)^[179]

2.20 g (20.0 mmol, 1.00 Äq.) Resorcin wurden in 5 ml 1,4-Dioxan gelöst und anschließend mit 0.4 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Zu dieser Lösung wurden 2.2 ml (2.32 g, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) Acetessigsäuremethylester tropfenweise bei Raumtemperatur zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf 60 °C erwärmt. Nach Abkühlen des Gemisches fiel ein Feststoff aus, welcher abgesaugt und mit wenig Wasser/Ethanol und Wasser gewaschen wurde. Der Feststoff wurde in 10%-iger NaOH-Lösung gelöst und dann mit 5%-iger Schwefelsäure auf pH 4 gebracht. Das Hydroxycumarin **71** (2.59 g, 14.8 mmol, 74% d. Th.) fiel als weißer Feststoff aus.

$R_f(\mathbf{71}) = 0.40$ (PE:EE 1:1)

**71**

¹H-NMR (400 MHz, MeOD):

$\delta = 2.41$ (d, $^4J_{10,5} = 1.1$ Hz, 3 H, 10-H), 6.09 (s, 1 H, 5-H), 6.69 (d, $^4J_{8,1} = 2.4$ Hz, 1 H, 8-H), 6.81 (dd, $^3J_{1,2} = 8.7$ Hz, $^4J_{1,8} = 2.4$ Hz, 1 H, 1-H), 7.58 (d, $^3J_{2,1} = 8.7$ Hz, 1 H, 2-H), OH nicht sichtbar,.

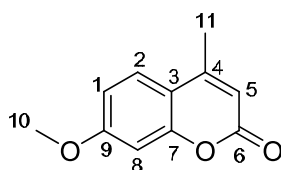
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD):

$\delta = 18.7$ (q, C-10), 103.5 (d, C-8), 111.3 (d, C-5), 113.9 (s, C-3), 114.4 (d, C-1), 127.5 (d, C-2), 156.0 (s, C-4), 156.5 (s, C-7), 163.0 (s, C-9), 163.9 (s, C-6).

7-Methoxy-4-methylcumarin (72)^[179]

2.47 g (14.0 mmol, 1.00 Äq.) des 7-Hydroxy-4-methylcumarins **71** wurden in 50 ml Aceton gelöst und mit 3.87 g (28.0 mmol, 2.00 Äq.) Kaliumcarbonat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min unter Rückfluss erhitzt, bevor 1.1 ml (2.38 g, 16.8 mmol, 1.20 Äq.) Methyljodid zugetropft wurden. Nach Erhitzen unter Rückfluss über Nacht wurde das warme Gemisch filtriert, nach Einengen des Filtrats am Rotationsverdampfer wurden 3.27 g (17.2 mmol, 86 % d. Th.) des 7-Methoxy-4-methylcumarins **72** als weißer Feststoff erhalten.

$R_f(\mathbf{72}) = 0.31$ (PE:EE 7:3)

**72**

¹H-NMR (400 MHz, MeOD):

δ = 2.44 (d, $^4J_{11,5}$ = 1.1 Hz, 3 H, 11-H), 3.89 (s, 3 H, 10-H), 6.16 (s, 1 H, 5-H), 6.89 (d, $^4J_{8,1}$ = 2.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.97 (dd, $^3J_{1,2}$ = 8.7 Hz, $^4J_{1,8}$ = 2.4 Hz, 1 H, 1-H), 7.68 (d, $^3J_{2,1}$ = 8.7 Hz, 1 H, 2-H).

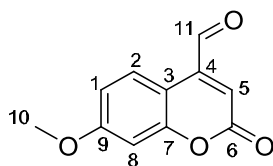
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD):

δ = 18.7 (q, C-11), 56.5 (q, C-10), 101.8 (d, C-8), 107.5 (d, C-5), 112.1 (s, C-3), 113.7 (d, C-1), 127.4 (d, C-2), 155.8 (s, C-4), 156.5 (s, C-7), 163.6 (s, C-9), 164.6 (s, C-6).

4-Formyl-7-methoxycumarin (73)^[179]

Zu einer Lösung aus 1.61 g (8.46 mmol, 1.00 Äq.) 7-Methoxy-4-methylcumarin **72** in 22 ml Xylol wurden 1.47 g (11.4 mmol, 1.35 Äq.) Selensäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend heiß filtriert. Nach Abkühlen des Filtrats fielen gelbe Kristalle aus, die abgesaugt und getrocknet wurden. Aus der Reaktion gingen 1.47 g (7.19 mmol, 85 % d. Th.) des formylierten Cumarins **73** als gelber Feststoff hervor.

$R_f(\mathbf{73})$ = 0.55 (PE:EE 1:1)

**73****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 3.89 (s, 3 H, 10-H), 6.71 (s, 1 H, 5-H), 6.89 (d, $^4J_{8,1}$ = 2.6 Hz, 2 H, 8-H), 6.92 (dd, $^3J_{1,2}$ = 9.0 Hz, $^4J_{1,8}$ = 2.6 Hz, 1 H, 1-H), 8.49 (d, $^3J_{2,1}$ = 9.0 Hz, 1 H, 2-H), 10.07 (s, 1 H, 11-H).

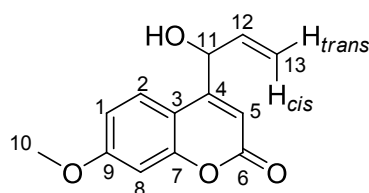
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 55.8 (q, C-10), 101.1 (d, C-8), 112.2 (s, C-3), 113.3 (d, C-1), 127.4 (d, C-2), 143.8 (d, C-5), 156.5 (s, C-7), 160.8 (s, C-9), 163.4 (s, C-6), 166.4 (s, C-4), 191.8 (s, C-11).

4-(1-Hydroxy-allyl)-7-methoxycumarin (74)

Bei -20 °C wurden zu einer Lösung aus 613 mg (3.00 mmol, 1.00 Äq.) des Aldehyds **73** in 55 ml abs. THF eine 1 M Vinylmagnesiumbromid-Lösung in THF (3.60 ml, 3.60 mmol, 1.10 Äq.) langsam zugetropft. Danach wurde das Kältebad entfernt und bis zum vollständigen Umsatz (3 h) weitergerührt. Anschließend wurde mit Dichlormethan verdünnt und bei 0 °C mit 1 M NH₄Cl-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Roh-Allylalkohol **74** direkt zum Carbonat umgesetzt.

$R_f(74) = 0.10$ (PE:EE 1:1)



74

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

$\delta = 3.87$ (s, 3 H, 10-H), OH nicht sichtbar, 5.42 (dd, $^3J_{13trans,12} = 10.2$ Hz, $^2J_{13trans,13cis} = 0.7$ Hz, 1 H, 13_{trans}-H), 5.36 (dd, $^3J_{13cis,12} = 17.2$ Hz, $^2J_{13cis,13trans} = 0.7$ Hz, 1 H, 13_{cis}-H), 5.89 (m, 1 H, 12-H), 6.28 (m, 1 H, 11-H), 6.41 (s, 1 H, 5-H), 6.81–6.88 (sh, 2 H, 1-H, 8-H), 7.55 (d, $^3J_{2,1} = 9.2$ Hz, 1 H, 2-H).

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

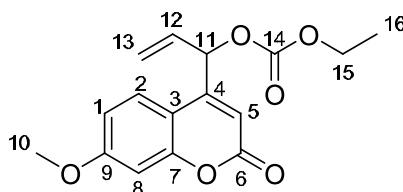
$\delta = 55.7$ (q, C-10), 71.0 (d, C-11), 101.1 (d, C-8), 109.5 (d, C-5), 112.3 (d, C-1, s, C-3), 118.7 (t, C-13), 125.8 (d, C-2), 137.0 (d, C-12), 152.9 (s, C-7), 155.3 (s, C-9), 161.6 (s, C-6), 162.5 (s, C-4).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4$ [M] ⁺	232.0736	232.0686

1-(7-Methoxycoumarin)-allylcarbonat (75)

Gemäß **AAV 8** wurde der Allylalkohol **74** (3.00 mmol, 1.00 Äq) in 3 ml (1 ml/mmol) trockenem Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 0.6 ml (1.95 g, 6.00 mmol, 2.00 Äq.) Chlorameisensäureethylester versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf RT erwärmt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) wurden 383 g (1.26 mmol, 42 % d. Th. über zwei Stufen) des Allylcarbonates **75** als gelbes Öl erhalten.

$R_f(75) = 0.24$ (PE:EE 7:3)



75

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

$\delta = 1.33$ (t, $^3J_{16,15} = 7.1$ Hz, 3 H, 16-H), 3.87 (s, 3 H, 10-H), 4.23 (q, $^3J_{15,16} = 7.1$ Hz, 2 H, 15-H), 5.42 (dd, $^3J_{13trans,12} = 10.2$ Hz, $^2J_{13trans,13cis} = 0.7$ Hz, 1 H, 13_{trans}-H), 5.36 (dd, $^3J_{13cis,12} = 17.2$ Hz, $^2J_{13cis,13trans} = 0.7$ Hz, 1 H, 13_{cis}-H), 5.89 (m, 1 H, 12-H), 6.28 (m, 1 H, 11-H), 6.41 (s, 1 H, 5-H), 6.81–6.88 (sh, 2 H, 1-H, 8-H), 7.55 (d, $^3J_{2,1} = 9.2$ Hz, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 14.2 (q, C-16), 55.8 (q, C-10), 64.8 (t, C-15), 74.9 (d, C-11), 101.2 (d, C-8), 110.3 (d, C-5), 112.6 (d, C-1, s, C-3), 120.8 (d, C-13), 125.6 (d, C-2), 132.7 (d, C-12), 151.6 (s, C-14), 154.0 (s, C-7), 155.9 (s, C-9), 160.9 (s, C-6), 162.8 (s, C-4).

Elementaranalyse:

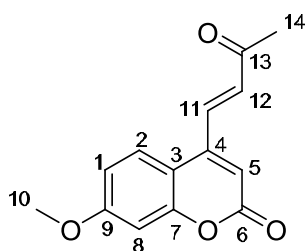
C ₁₆ H ₁₆ O ₆	Ber.	C 63.15	H 5.30
(304.29)	Gef.	C 63.75	H 5.81

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₆ H ₁₆ O ₆ [M] ⁺	304.0947	304.0970

(E)-7-Methoxy-4-(3-oxo-but-1-enyl)cumarin (76)

261 mg (0.82 mmol, 1.03 Äq.) 1-Triphenylphosphanyliden-2-propanon wurden in 50 ml THF suspendiert. Nach der Zugabe von 163 mg (0.80 mmol, 1.00 Äq.) fluoreszierendem Aldehyd **73** wurde die Reaktionsmischung 23 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE), wobei 187 mg (0.77 mmol, 96 % d. Th.) des Wittig-Produktes **76** als gelber Feststoff erhalten wurden.

R_f(76) = 0.14 (PE:EE 7:3)

**76****¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 2.44 (s, 3 H, 14-H), 3.89 (s, 3 H, 10-H), 6.40 (s, 1 H, 5-H), 6.81 (d, ³J_{12,11} = 15.9 Hz, 1 H, 12-H), 6.86–6.89 (sh, 2 H, 1-H, 8-H), 7.58 (d, ³J_{2,1} = 8.9 Hz, 1 H, 2-H), 7.72 (d, ³J_{11,12} = 15.9 Hz, 1 H, 11-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 28.8 (q, C-14), 55.8 (q, C-10), 101.4 (d, C-8), 110.1 (d, C-5), 112.7 (d, C-1, s, C-3), 125.4 (d, C-2), 133.7 (d, C-11), 134.9 (d, C-12), 152.9 (s, C-7), 155.7 (s, C-9), 160.8 (s, C-6), 163.2 (s, C-4), 196.7 (s, C-13).

Elementaranalyse:

C ₁₄ H ₁₂ O ₄	Ber.	C 68.85	H 4.95
(244.07)	Gef.	C 68.95	H 5.01

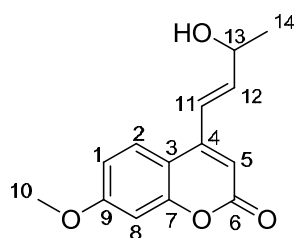
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₁₄ H ₁₂ O ₄ [M] ⁺	244.0736	244.0766

Schmelzpunkt: 135–138 °C

(E)-4-(3-Hydroxy-but-1-enyl)-7-methoxycumarin (77)

184 mg (0.75 mmol, 1.00 Äq.) des Wittig-Produktes **76** wurden zusammen mit 279 mg (0.75 mmol, 1.03 Äq.) $\text{CeCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 2 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden innerhalb von 5 min 28 mg (0.75 mmol, 1.00 Äq.) Natriumborhydrid zugegeben. Nach weiteren 5 min Rühren bei RT wurde mit 1 M KHSO_4 -Lösung hydrolysiert und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Roh-Alkohol **77** wurde direkt zum Carbonat umgesetzt.

$R_f(\mathbf{77}) = 0.16$ (PE:EE 1:1)

**77**

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

$\delta = 1.41$ (d, $^3J_{14,13} = 6.5$ Hz, 3 H, 14-H), 1.88 (bs, 1 H, OH), 3.87 (s, 3 H, 10-H), 4.52 (qd, $^3J_{13,14} = ^3J_{13,12} = 6.5$ Hz, 1 H, 13-H), 6.21 (s, 1 H, 5-H), 6.43 (dd, $^3J_{12,11} = 15.6$ Hz, $^3J_{12,13} = 6.5$ Hz, 1 H, 12-H), 6.70–6.83 (sh, 3 H, 1-H, 11-H, 8-H), 7.56 (d, $^3J_{2,1} = 8.8$ Hz, 1 H, 2-H).

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

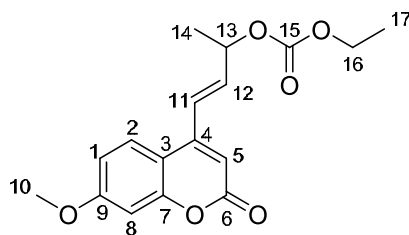
$\delta = 28.3$ (q, C-14), 55.8 (q, C-10), 68.0 (d, C-13), 101.1 (d, C-8), 107.9 (s, C-5), 112.3 (d, C-1, s, C-3), 121.5 (d, C-2), 128.5 (d, C-11), 132.0 (d, C-12), 150.5 (s, C-7), 155.6 (s, C-9), 161.6 (s, C-6), 162.8 (s, C-4).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$ [M] ⁺	246.0892	246.0861

(E)-3-(7-Methoxycumarin)-1-methyl-allylethylcarbonat (78)

Gemäß **AAV 8** wurde der Allylalkohol **77** (0.75 mmol, 1.00 Äq.) in 0.75 ml (1ml/mmol) trockenem Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 0.14 ml (163 mg, 1.50 mmol, 2.00 Äq.) Chlorameisensäureethylester versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen gelassen. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) wurden 175 mg (0.55 mmol, 73 % d. Th. über zwei Stufen) des Allylcarbonates **78** als gelber Feststoff erhalten.

$R_f(\mathbf{78}) = 0.26$ (PE:EE 7:3)



78

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

δ = 1.34 (t, $^3J_{17,16} = 7.1$ Hz, 3 H, 17-H), 1.50 (d, $^3J_{14,13} = 6.7$ Hz, 3 H, 14-H), 3.88 (s, 3 H, 10-H), 4.23 (q, $^3J_{16,17} = 7.1$ Hz, 2 H, 16-H), 5.42 (qd, $^3J_{13,14} = ^3J_{13,12} = 6.5$ Hz, 1 H, 13-H), 6.28 (s, 1 H, 5-H), 6.39 (dd, $^3J_{12,11} = 15.7$ Hz, $^3J_{12,13} = 6.5$ Hz, 1 H, 12-H), 6.83–6.90 (sh, 3 H, 1-H, 11-H, 8-H), 7.56 (d, $^3J_{2,1} = 8.8$ Hz, 1 H, 2-H).

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

δ = 14.2 (q, C-17), 20.2 (q, C-14), 55.8 (q, C-10), 64.2 (t, C-16), 73.7 (d, C-13), 101.1 (d, C-8), 108.9 (d, C-5), 112.2 (d, C-1, s, C-3), 124.5 (d, C-2), 125.6 (d, C-11), 137.4 (d, C-12), 143.0 (d, C-5), 149.9 (s, C-7), 155.6 (s, C-9), C-15 nicht sichtbar, 161.3 (s, C-6), 162.8 (s, C-4).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$	Ber.	C 64.14	H 5.70
(318.32)	Gef.	C 64.79	H 5.59

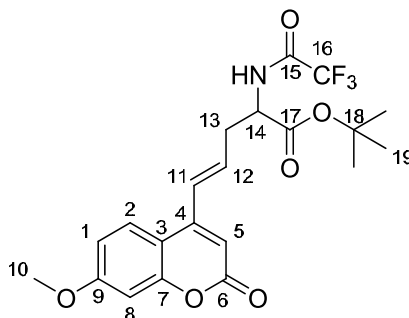
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$ [M] ⁺	318.1103	318.1152

Schmelzpunkt: 76–77 °C

5-(7-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)-2-(2,2,2-trifluoracetylamino)-pent-4-ensäure-*tert*-butylester (79)

Gemäß **AAV 9** wurde 64 mg (0.28 mmol, 1.10 Äq.) TFA-Glycin-*tert*-butylester mit 76 mg (0.25 mmol, 1.00 Äq.) des 7-Methoxy-Carbonats **75** umgesetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) wurden ausschließlich 75 mg (0.17 mmol, 68 % d. Th.) des unverzweigten Regioisomeren **79** als gelbes Öl erhalten.

R_f(79) = 0.31 (PE:EE 7:3)



79

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.49 (s, 9 H, 19-H), 2.81 (m, 1 H, 13-H), 3.00 (m, 1 H, 13'-H), 3.86 (s, 3 H, 10-H), 4.65 (m, 1 H, 14-H), 6.22 (s, 1 H, 5-H), 6.28 (dt, $^3J_{12,11} = 15.7$ Hz, $^3J_{12,13} = 7.4$ Hz, 1 H, 12-H), 6.70 (d, $^3J_{11,12} = 15.7$ Hz, 1 H, 11-H), 6.80–6.85 (sh, 2 H, 1-H, 8-H), 7.20 (d, $^3J_{\text{NH},14} = 6.8$ Hz, 1 H, NH), 7.49 (d, $^3J_{2,1} = 8.8$ Hz, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

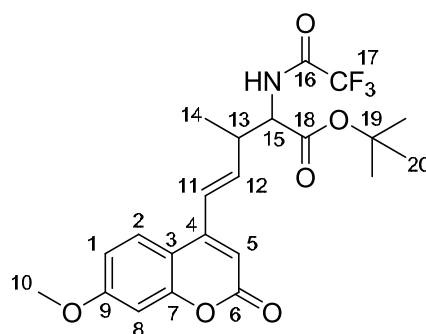
δ = 28.0 (q, C-19), 35.5 (t, C-13), 55.7 (q, C-10), 60.4 (d, C-14), 84.1 (s, C-18), 101.2 (d, C-8), 108.3 (d, C-5), 111.8 (s, C-3), 112.4 (d, C-1), C-16 nicht sichtbar, 125.5 (d, C-2), 127.5 (d, C-11), 132.6 (d, C-12), 149.9 (s, C-7), 155.6 (s, C-9), C-15 nicht sichtbar, 161.5 (s, C-6), 162.9 (s, C-4), 168.8 (s, C-17).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₁ H ₂₂ NO ₆ F ₃ [M] ⁺	441.1399	441.1412

5-(7-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)-3-methyl-2-(2,2,2-trifluoracetyl-amino)-pent-4-ensäure-*tert*-butylester (**80**)

Gemäß **AAV 9** wurde 64 mg (0.28 mmol, 1.10 Äq.) TFA-Glycin-*tert*-butylester mit 80 mg (0.25 mmol, 1.00 Äq.) des 7-Methoxy-Carbonats **78** umgesetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) wurden ausschließlich 72 mg (0.16 mmol, 63 % d. Th.) des unverzweigten Regioisomeren **80** als gelbes Öl erhalten.

$R_f(\mathbf{80}) = 0.39$ (PE:EE 7:3)



80

Hauptdiastereomer *anti* (70 %):**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.22 (d, $^3J_{14,13} = 6.7$ Hz, 3 H, 14-H), 1.49 (s, 9 H, 20-H), 3.09 (m, 1 H, 13-H), 3.87 (s, 3 H, 10-H), 4.63 (dd, $^3J_{15,\text{NH}} = 7.8$ Hz, $^3J_{15,13} = 4.6$ Hz, 1 H, 15-H), 6.26 (s, 1 H, 5-H), 6.38 (dd, $^3J_{12,11} = 15.6$ Hz, $^3J_{12,13} = 7.8$ Hz, 1 H, 12-H), 6.71 (d, $^3J_{11,12} = 15.6$ Hz, 1 H, 11-H), 6.82–6.91 (sh, 2 H, 1-H, 8-H), 7.01 (d, $^3J_{\text{NH},15} = 7.8$ Hz, 1 H, NH), 7.52 (d, $^3J_{2,1} = 8.7$ Hz, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 15.5 (q, C-14), 28.1 (q, C-20), 40.3 (d, C-13), 55.8 (q, C-10), 59.9 (d, C-15), 84.1 (s, C-19), 101.2 (d, C-8), 108.2 (d, C-5), 112.4 (d, C-1, s, C-3), C-17 nicht sichtbar, 124.9 (d, C-2), 125.3 (d, C-11), 139.0 (d, C-12), 150.1 (s, C-7), 155.7 (s, C-9), C-16 nicht sichtbar, 161.5 (s, C-6), 162.9 (s, C-4), 168.4 (s, C-18).

Nebendiastereomer *syn* (30 %, ausgewählte Signale):**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.50 (s, 9 H, 20-H), 3.88 (s, 3 H, 10-H), 4.11 (m, 1 H, 13-H), 4.21 (dd, ³J_{15,NH} = 7.8 Hz, ³J_{15,13} = 4.6 Hz, 1 H, 15-H), 6.25 (s, 1 H, 5-H), 6.64 (d, ³J_{11,12} = 15.6 Hz, 1 H, 11-H), 6.99 (d, ³J_{NH,15} = 7.8 Hz, 1 H, NH), 7.69 (d, ³J_{2,1} = 8.7 Hz, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

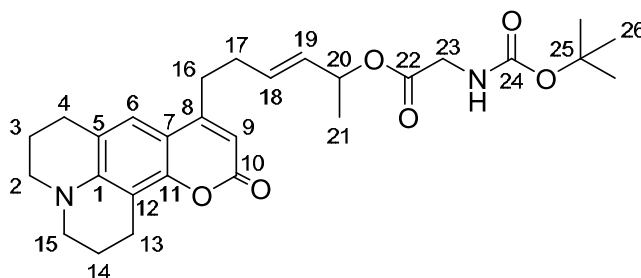
δ = 15.2 (q, C-14), 28.0 (q, C-20), 35.9 (d, C-13), 56.5 (q, C-10), 60.4 (d, C-15), 73.7 (s, C-19), 100.9 (d, C-8), 111.8 (d, C-1, s, C-3), 137.5 (d, C-12), 150.1 (s, C-7), 155.7 (s, C-9), C-16 nicht sichtbar, 161.5 (s, C-6), 162.9 (s, C-4), 168.4 (s, C-18).

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₃ H ₂₅ F ₃ NO ₆ [M+H] ⁺	456.1628	456.1607

***tert*-Butoxycarbonylamino-essigsäure-1-methyl-5-(10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3*a*-aza-benzo[*de*]anthracen-8*yl*)-pent-2-enylester (**81**)**

443 mg (2.53 mmol, 1.00 Äq.) Boc-Glycin wurden zusammen mit 860 mg (2.53 mmol, 1.00 Äq.) des Luche-Produktes **65**, 155 mg (1.27 mmol, 0.50 Äq.) DMAP und 1.3 ml (981 mg, 7.59 mmol, 3.00 Äq.) DIPEA in 6 ml Dichlormethan gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde bei 0 °C mit 1.38 g (4.30 mmol, 1.70 Äq.) TBTU versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die organische Phase mit 1 M HCl-Lösung sowie ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE → EE) wobei 869 mg (1.75 mmol, 69 % d. Th.) des Produktes **81** als gelbes, glasartiges Öl erhalten wurden.

R_f(81) = 0.12 (PE:EE 1:1)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ = 1.29 (d, $^3J_{21,20}$ = 6.5 Hz, 3 H, 21-H), 1.45 (s, 9 H, 26-H), 1.95–1.99 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.38 (td, $^3J_{17,16}$ = 15.0 Hz, $^3J_{17,18}$ = 7.0 Hz, 2 H, 17-H), 2.68–2.78 (sh, 4 H, 4-H, 16-H), 2.88 (t, $^3J_{13,14}$ = 6.5 Hz, 2 H, 13-H), 3.22–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.81 (d, $^3J_{23,NH}$ = 5.3 Hz, 1 H, 23-H), 5.15 (bs, 1 H, NH), 5.37 (qd, $^3J_{20,21}$ = $^3J_{20,19}$ = 6.5 Hz, 1 H, 20-H), 5.47 (dd, $^3J_{19,18}$ = 15.4 Hz, $^3J_{19,20}$ = 6.5 Hz, 1 H, 19-H), 5.76 (m, 1 H, 18-H), 5.84 (s, 1 H, 9-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ = 20.2 (t, C-13), 20.5 (t, C-3/C-14), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (q, C-21), 27.8 (t, C-4), 28.3 (q, C-26), 30.9 (2t, C-16, C-17), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 72.0 (d, C-20), 79.8 (s, C-25), 107.0 (d, C-9), 107.4 (s, C-7/C-12), 107.9 (s, C-7/C-12), 118.0 (s, C-5), 121.3 (d, C-6), 130.6 (d, C-19), 131.8 (d, C-18), 145.7 (s, C-1), 151.3 (s, C-11), 155.6 (s, C-8), C-24 nicht sichtbar, 162.6 (s, C-10), 169.7 (s, C-22).

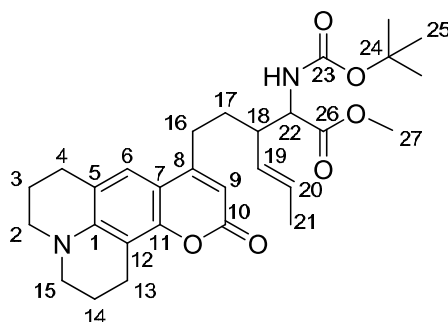
HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
C ₂₂ H ₃₀ NO ₂ [M-BocGly+H] ⁺	340.2271	340.2205
Absorptionsmax.:	388 nm	
Emissionsmax.:	455 nm	
Lebenszeit:	4.0 ns	
Quantenausbeute:	1.0	

2-tert-Butoxycarbonylamino-3-[2-10-oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H,10H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-8-yl)-ethyl]hex-4-ensäuremethylester (82)

Zuerst wurde in einem ausgeheizten Schlenkrohr unter Schutzgasatmosphäre die Basenlösung bereitet. Hierzu wurden 158 mg (1.56 mmol, 3.00 Äq) frisch destilliertes Di-*iso*-propylamin in 4.5 ml abs. THF gelöst und auf –78 °C abgekühlt. Mit 0.9 ml (1.51 mmol, 2.90 Äq.) *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan) wurde anschließend deprotoniert, 5 min bei dieser Temperatur nachgerührt und dann nach Entfernen des Kältebads 10 min bei RT gerührt. Die bereitete Basenlösung wurde erneut auf –78 °C gekühlt. In einem zweiten Schlenkrohr wurden 84 mg (0.62 mmol, 1.20 Äq.) Zinkchlorid ausgeheizt und in 1.5 ml abs. THF suspendiert. Anschließend wurde eine Lösung aus 259 mg (0.52 mmol, 1.00 Äq.) des umzulagernden Allylester **81** in 1.3 ml abs. THF zugegeben und die Substratlösung auf –78 °C herabgekühlt. Mit Hilfe einer Transferkanüle wurde die gekühlte Basenlösung langsam zur Substratlösung getropft, die resultierende Lösung wurde über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit 1 M HCl-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt und die erhaltene Rohsäure in 1 ml abs. DMF aufgenommen. Nach Zugabe von 86 mg (0.62 mmol, 1.20 Äq.) Kaliumcarbonat wurde auf 0 °C gekühlt und langsam 0.1 ml (221 mg, 1.56 mmol, 3.00 Äq.) Methyljodid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt und

anschließend mit dest. Wasser verdünnt. Nach mehrmaliger Extraktion mit Dichlormethan wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Flashchromatograph, Gradient PE:EE, Start: PE:EE 9:1 → EE) gereinigt, wobei 245 mg (0.47 mmol, 92 % d. Th.) des *syn*-konfigurierte Umlagerungsproduktes **82** als gelber Feststoff erhalten wurden.

$R_f(\mathbf{82}) = 0.47$ (PE:EE 1:1)



82

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

$\delta = 1.43$ (s, 9 H, 25-H), 1.73 (dd, $^3J_{21,20} = 6.4$ Hz, $^4J_{21,19} = 1.5$ Hz, 3 H, 21-H), 1.94–2.00 (sh, 4 H, 3-H, 14-H), 2.33 (m, 1 H, 17-H), 2.50–2.62 (sh, 3 H, 16-H, 17'-H), 2.77 (t, $^3J_{4,3} = 6.3$ Hz, 2 H, 4-H), 2.88 (t, $^3J_{13,14} = 6.5$ Hz, 2 H, 13-H), 3.21–3.27 (sh, 4 H, 2-H, 15-H), 3.69 (s, 3 H, 27-H), 4.28 (m, 1 H, 18-H), 5.03 (d, $^3J_{22,18} = 8.9$ Hz, 1 H, 22-H), 5.18 (dd, $^3J_{19,20} = 15.2$ Hz, $^3J_{19,18} = 9.6$ Hz, 1 H, 19-H), 5.61 (dq, $^3J_{20,19} = 15.2$ Hz, $^3J_{20,21} = 6.4$ Hz, 1 H, 20-H), 5.80 (s, 1 H, 9-H), 6.88 (s, 1 H, 6-H).

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

$\delta = 18.1$ (q, C-21), 20.5 (t, C-13), 20.7 (t, C-3/C-14), 21.6 (t, C-3/C-14), 27.8 (t, C-4), 28.3 (q, C-25), 29.3 (t, C-17), 30.5 (t, C-16), 46.2 (d, C-18), 49.5 (t, C-2/C-15), 49.9 (t, C-2/C-15), 52.0 (q, C-27), 57.1 (d, C-22), 80.1 (s, C-24), 107.2 (d, C-9), 107.9 (s, C-7/C-12), 109.9 (s, C-7/C-12), 117.9 (s, C-5), 121.4 (d, C-6), 128.8 (d, C-20), 130.4 (d, C-19), 145.7 (s, C-1), 151.4 (s, C-11), C-8 und C-23 nicht sichtbar, 162.6 (s, C-10), 162.9 (s, C-26).

Elementaranalyse:

$\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$	Ber.	C 68.21	H 7.50	N 5.49
(510.62)	Gef.	C 67.89	H 7.38	N 5.20

HRMS (CI):	Berechnet	Gefunden
$\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$ [M] ⁺	510.2730	510.2745

Schmelzpunkt: 108–112 °C

Absorptionsmax.: 354 nm

Emissionsmax.: 453 nm

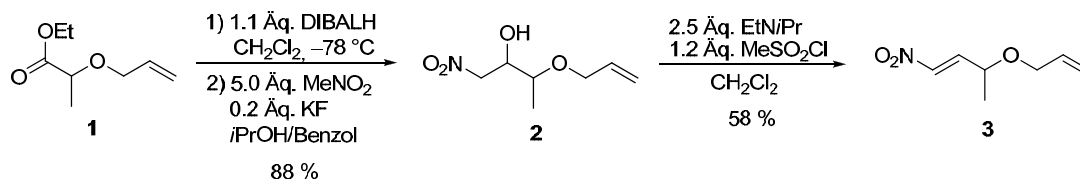
Lebenszeit: 4.0 ns

Quantenausbeute: 1.0

8 Zusammenfassung

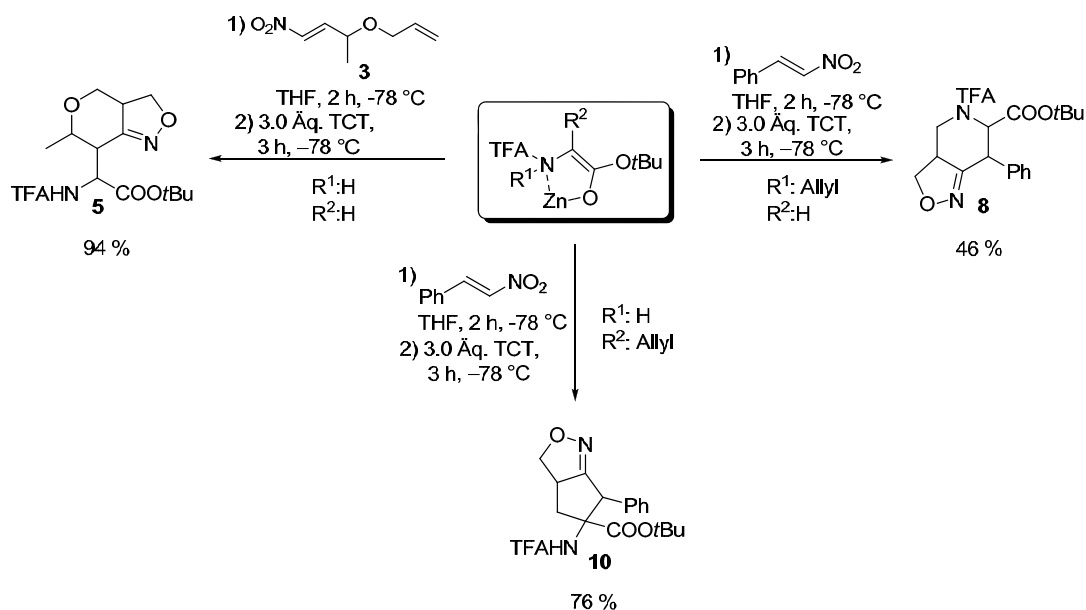
8.1 Entwicklung einer effizienten Synthese von Isoxazolin-Aminosäureesterderivaten (Teil A)

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, eine effektive Eintopf-Synthese von Isoxazolin-Aminosäureesterderivaten zu entwickeln. Durch Kombination der Michael-Addition eines chelatisierten Enolates mit einer *in situ* Nitriloxid-Transformation und einer anschließenden [3+2]-Cycloaddition sollten diese Aminosäurederivate leicht aus Nitroalkenen zugänglich gemacht werden. Weiter sollte das Dipolarophil für die intramolekulare Cycloaddition einerseits über das Nukleophil und andererseits über den Michael-Akzeptor, das Nitroalken, eingeführt werden, um unterschiedliche Klassen von heterocyclischen Aminosäuren herstellen zu können. Um das Dipolarophil über den Akzeptor *via* Michael-Addition in die Cyclisierungsvorstufe einführen zu können, wurde zunächst ein Nitroalken, das zugleich eine Doppelbindung als Dipolarophil trägt, synthetisiert (Schema 8.1). Dahingegen konnte durch Einsatz eines *N*- bzw. *C*-allylierten Glycinesters, der leicht aus *N*-trifluoroacetylierten Glycinestern durch Palladium-katalysierte allylische Alkylierung zugänglich ist,^[71, 72] das Dipolarophil durch das Nukleophil bereitgestellt werden.



Schema 8.1 Synthese des Nitroalkens **3**.

Anschließend an die Synthese des mit einem Dipolarophil modifizierten Nitroalkens **3** und der *N*- und *C*-Allylglycinestern wurden die Michael-Additionen dieser Verbindungen untersucht und optimiert. Die resultierenden Bedingungen der Michael-Additionen wurden im nächsten Schritt auf die Domino-Sequenz zur Synthese von Isoxazolinen übertragen. Durch *in situ* Zugabe des wasserentziehenden Mittels Cyanurchlorid (TCT) nach Abklingen der Michael-Additionen wurden Nitriloxide generiert, welche spontan mit dem Dipolarophil zu Isoxazolinen mit moderaten bis guten Ausbeuten cyclisierten.

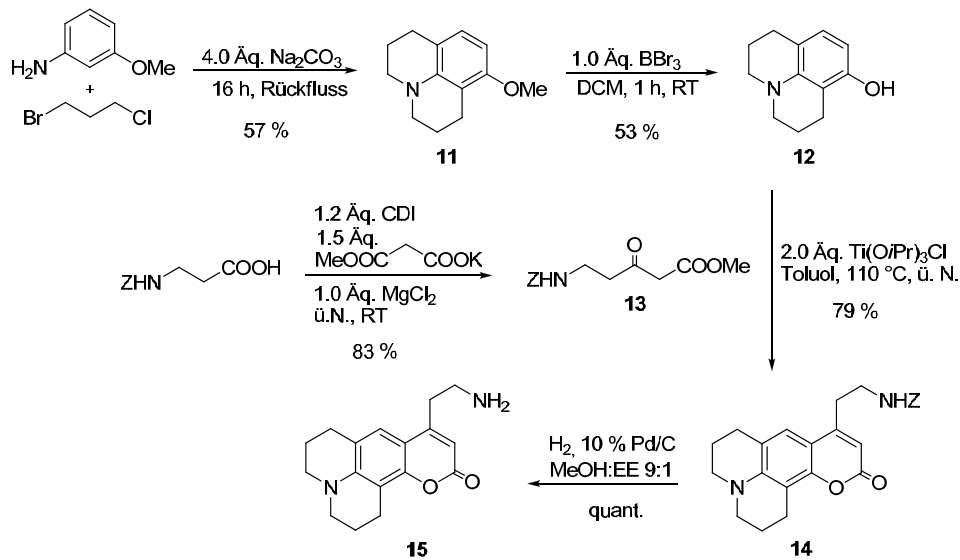


Schema 8.2 Domino-Synthesen der verschiedenen Isoxazolin-Aminosäureesterderivaten.

8.2 Entwicklung und Anwendung von 7-Dialkyl-Aminocumarin-Fluoreszenz-Labels (Teil B)

8.2.1 Synthese und Charakterisierung eines *false fluorescent neurotransmitters* (FFN) und dessen Aminocumarin-Derivate

Ausgehend von 3-Methoxyanilin wurde durch Reaktion mit 1-Brom-3-chlorpropan und anschließender Etherspaltung ein tricyclisches 7-Dialkyl-aminophenol **12** aufgebaut (Schema 8.3). Dieses Phenol **12** wurde anschließend in einer Pechmann-Kondensation mit einem β -Ketoester **13**, der aus *N*-Benzylcarbamatsgeschütztem β -Alanin synthetisiert wurde, umgesetzt. Um das Aminocumarin **14** in präparativ nutzbaren Mengen zu erhalten, mussten die Reaktionsbedingungen der säurekatalysierten Pechmann-Kondensation optimiert werden. Dabei wurden unterschiedliche Säuren in Kombination mit unterschiedlichen Reaktionstemperaturen in der Kondensation getestet. Erst durch Einsatz von zwei Äquivalenten der Titan-Lewisäure $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_3\text{Cl}$ wurde das Aminocumarin **14** in präparativ sinnvollen Mengen isoliert. Im letzten Schritt wurde die Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung gespalten. Das freie Amin **15** wurde als *false fluorescent neurotransmitter* (FFN) zur Verfolgung der Sekretion des Hormons Adrenalin in Chromaffinzellen eingesetzt und lieferte gute Ergebnisse. Der FFN **15** zeigte eine ausreichende Fluoreszenz zur Verfolgung der Sekretion und beeinträchtigte gleichzeitig nicht die Zellfunktion. Zusätzlich wurde das Aminocumarin **15** durch Aufnahme von Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektren spektroskopisch charakterisiert ($\lambda_{\text{Abs}} = 389 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 454 \text{ nm}$) und Untersuchungen zur Solvatochromie durchgeführt. Es zeigte sich eine geringfügig bathochrome Verschiebung mit steigender Polarität des Lösungsmittels.



Schema 8.3 Synthese des *false fluorescent neurotransmitters* (FFN) **15**.

Damit die Physiologie-Arbeitsgruppe von Prof. J. Rettig (Uniklinikum Homburg) den FFN **15** neben dem Calcium-*Imaging* nicht nur detektieren sondern auch quantifizieren kann, sollte das Emissionsmaximum durch Erweiterung des π -System des FFN **15** zu längeren Wellenlängen verschoben werden. Da die Möglichkeit zur Erweiterung allerdings durch zwei Zelltransporter limitiert war, wurden die Transporter zunächst durch verschiedene, synthetisierte Derivate des FFN **15** (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) charakterisiert. In den physiologischen Tests zeigte sich, dass ausschließlich Aminocumarine, die eine Ethylaminseitenkette besitzen, in die Vesikel transportiert wurden. Im nächsten Schritt wurde das π -System des FFN **15** durch Palladium-katalysierte Kreuzkupplungsreaktionen in 3-Position erweitert (**33** und **34**), um die Emission bathochrom zu verschieben. Nur das „Suzuki“-Cumarin **33** wurde in die Vesikel geladen. Allerdings liefert es eine deutlich schlechtere Auflösung der Vesikel als das ursprünglich synthetisierte FFN **15** und auch die Verschiebung der Emissionswellenlänge war nicht ausreichend.

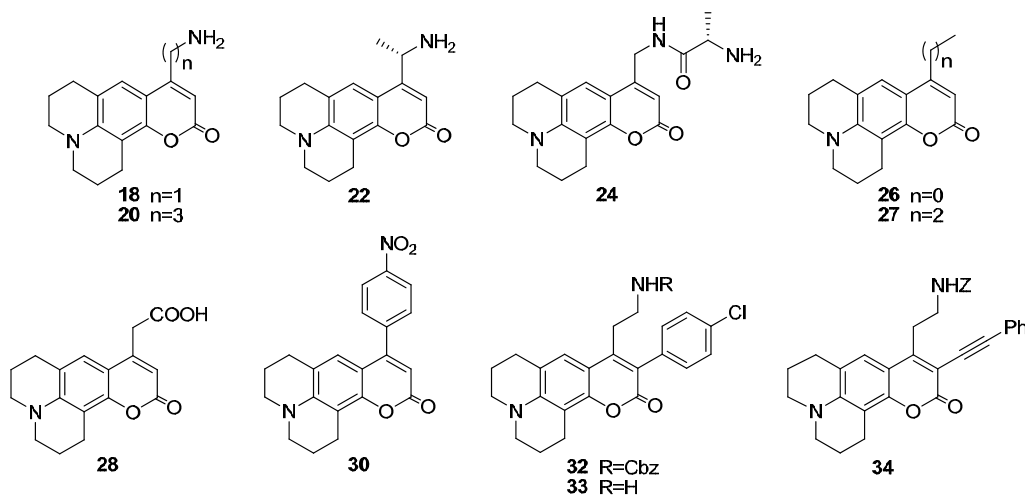


Abbildung 8.1 Übersicht der synthetisierten 7-Dialkyl-aminocumarinderivate.

8.2.2 Entwicklung von Fluoreszenz-Labels und deren Anwendung zur Modifizierung von Aminosäuren und Peptiden

Das biomolekulare *Imaging* ermöglicht mit Hilfe von Fluoreszenz-Labels, die u.a. durch bioorthogonale, chemische Reaktionen an das Biomolekül angebracht werden, die Erforschung von Proteinen in ihrer natürlichen Umgebung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue bioorthogonale Fluoreszenz-Labels sowie neue bioorthogonale Markierungstechniken für das biomolekulare *Imaging* von Aminosäuren und Peptiden entwickelt. Eine bereits bekannte bioorthogonale Markierungs-Methode ist die Kupfer-katalysierte Huisgen-Meldal-Sharpless-Click-Reaktion. Um diese vielseitige Azid-Acetylen-Click-Reaktion anwenden zu können, wurde sowohl ein 7-Dialkylcumarin-Label mit terminaler Acetylsenkette **36** als auch ein Label mit Azidfunktion **52** synthetisiert (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) Schlüsselschritt der Synthesen war die zuvor entwickelte Titan-katalysierte Pechmann-Kondensation (Schema 8.3).

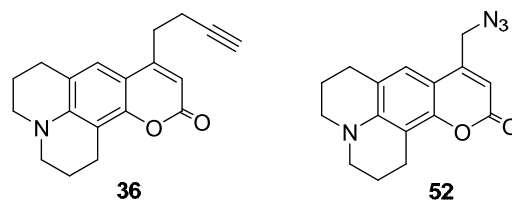
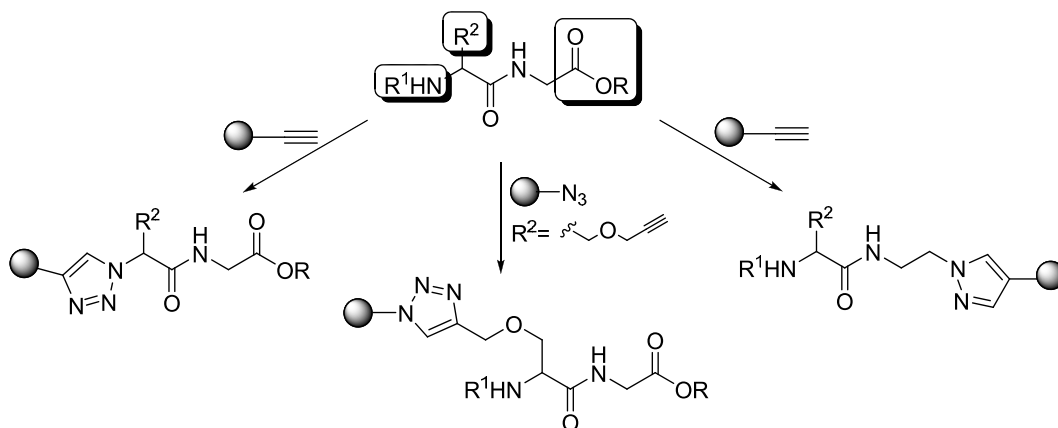


Abbildung 8.2 Übersicht über die beiden Click-Labels **36** und **52**.

Mit Hilfe der beiden Labels **36** und **52** war es möglich, verschiedene Aminosäuren und Peptide effizient an drei unterschiedlichen Positionen zu markieren (Schema 8.4). Dabei zeigte sich, dass die Click-Reaktionen bei Raumtemperatur sehr langsam verliefen (~6 d), sich aber durch Erwärmen auf 80 °C beschleunigen ließen. Alle Click-Reaktionen brachten die markierten Aminosäure bzw. das markierte Peptide in Ausbeuten um 80 % hervor. Zudem wurde ausschließlich das 1,4-Regioisomer gebildet.



Schema 8.4 Markierungspositionen der Aminosäuren und Peptide *via* Click-Chemie.

Neben der bereits bekannten „Click-Chemie“ wurden auch zwei neue Methoden zum Fluoreszenzmarkieren von Aminosäuren und Peptiden entwickelt. Diese beiden Methoden ermöglichten erstmals die Fluoreszenzmarkierung am Peptid-Rückgrat. Üblicherweise findet die Modifizierung an verschiedenen Seitenketten, am *N*- oder am *C*-Terminus statt. Eine dieser Markierungstechniken des Rückgrates beruht auf der Palladium-katalysierten allylischen Substitutionsreaktion. Speziell für die Anwendung in der allylischen Alkylierung wurden zwei 7-Aminocumarin-Labels **63** und **66** und zwei 7-Methoxycumarin-Labels **74** und **77** mit einer Allylcarbonatseitenkette hergestellt (Abbildung 8.3).

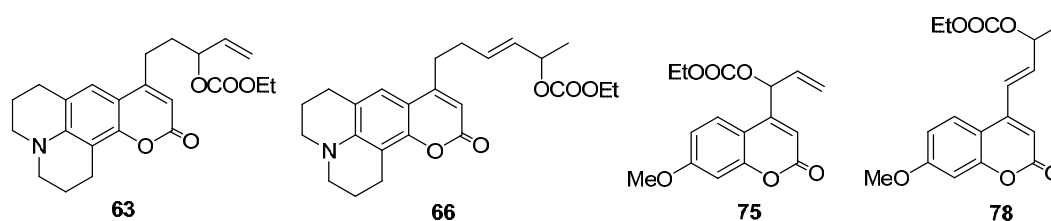
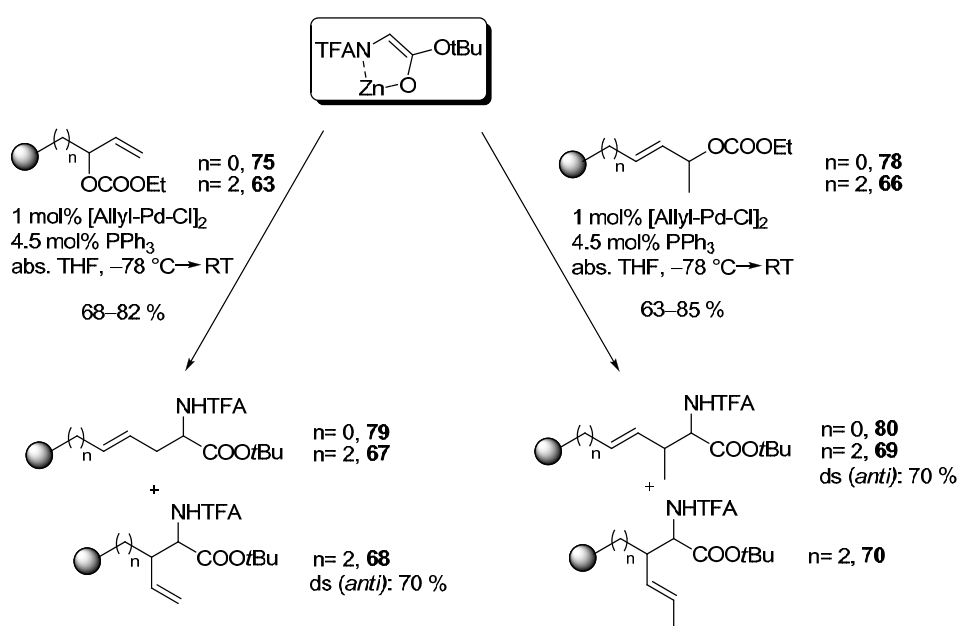


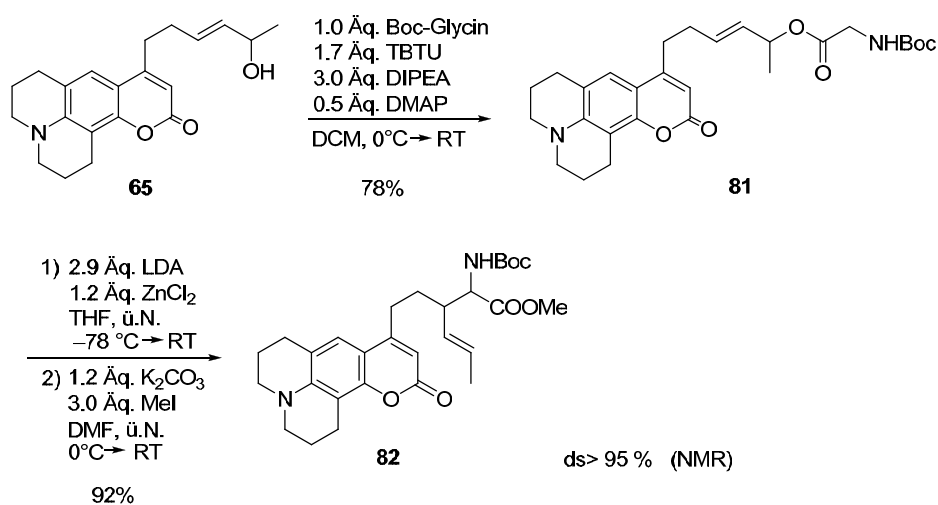
Abbildung 8.3 Übersicht der synthetisierten *Labels* für die allylische Alkylierung.

Im Anschluss an die Synthese der Allylcarbonat-Labels **63**, **66**, **75** und **78** wurden diese zur Fluoreszenzmarkierung von TFA-Glycin-*tert*-butylester eingesetzt. Die Palladium-katalysierten allylischen Alkylierungen verliefen in moderaten bis guten Ausbeuten. Bei Verwendung der 7-Aminocumarin-Labels **63** und **66** lieferte die Allylierung beide Regioisomere, während bei Einsatz der 7-Methoxycumarin-Labels **75** und **78** je nur ein Regioisomer des markierten Aminosäureesters hervorging.



Schema 8.5 Rückgrat-Markierungstechnik *via* Palladium-katalysierter allylischer Alkylierung.

Die zweite Rückgrat-Markierungstechnik beruht auf der Esterenolat-Claisen-Umlagerung. Für diese Markierungsmethode wurde von dem zuvor hergestellte 4-Allylalkohol-7-Aminocumarin **65** ausgegangen. Das Cumarin **65** wurde zunächst mit *N*-Boc-geschützten Glycin zum Allylester **81** umgesetzt, der im Anschluss in eine Esterenolat-Claisen-Umlagerung mit darauffolgender Veresterung zum γ,δ -ungesättigte Carbonsäuremethylester **82** umgelagert wurde. Während der Umlagerung fand die Übertragung des Fluoreszenz-Labels vom C-Terminus der Aminosäure auf das Rückgrat statt. Mit dieser Methode konnte *N*-Boc-Glycin mit exzellenter Ausbeute und Diastereoselektivität am Rückgrat fluoreszenzmarkiert werden.



Schema 8.6 Markierung des Rückgrates durch Esterenolat-Claisen-Umlagerung.

9 Literaturverzeichnis

- [1] P. Cameamella, P. Grünanger, *1,3-dipolare Cycloaddition Chemistry, Vol. 1*, Wiley, New York, **1984**.
- [2] V. Jäger, P. A. Colinas, *Synthetic Application of 1,3-dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products*, Wiley, New Jersey, **2003**.
- [3] R. Ballini, L. Barboni, A. Palmieri, *Synlett* **2007**, *14*, 3019-3021.
- [4] D. P. Curran, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5826-5833.
- [5] J. W. Bode, E. M. Carrera, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1587-1590.
- [6] A. A. Fuller, B. Chen, A. R. Minter, A. K. Mapp, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5376-5383.
- [7] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604-637.
- [8] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 742-754.
- [9] K. B. G. Torsell, *Nitrile Oxides, Nitrones and Nitronates in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, **1988**.
- [10] A. Hassner, K. S. K. Murthy, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5277-5286.
- [11] T. Mukaiyama, H. Nambu, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 2201-2204.
- [12] T. Shimizu, Y. Hayashi, H. Shibafuchi, K. Teramura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 2827-2831.
- [13] U. Kazmaier, H. Mues, A. Krebs, *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8*, 1850-1855.
- [14] U. Kazmaier, R. Grandel, *Synlett* **1995**, 945-946.
- [15] U. Kazmaier, C. Schmidt, *Synthesis* **2009**, 2435-2439.
- [16] B. Mendler, U. Kazmaier, *Synthesis* **2005**, 2239-2245.
- [17] B. Mendler, U. Kazmaier, V. Huch, M. Veith, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2643-2646.
- [18] B. Mendler, U. Kazmaier, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1715-1718.
- [19] D. Bergmann, D. Gunsberg, R. Rappo, *Org. React.* **1959**, *10*, 179-560.
- [20] D. A. Oare, C. H. Heathcock, *Top. Stereochem.* **1989**, *19*, 227-407.
- [21] D. A. Oare, C. H. Heathcock, *Top. Stereochem.* **1991**, *20*, 87-169.
- [22] N. Krause, A. Hoffmann-Röder, *Synthesis* **2001**, *2*, 171-196.
- [23] Latscha, Kazmaier, Klein, *Organische Chemie-Chemie Basiswissen II, Vol. 5*, Springer-Verlag.

-
- [24] C. Schmidt, *Dissertation* **2007**, Universität Saarbrücken.
- [25] C. R. Armstutz, W. B. Schweitzer, D. Seebach, J. D. Dunitz, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *55*, 2617-2621.
- [26] D. A. Oare, M. A. Henderson, M. A. Sanner, C. H. Heathcock, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 132-147.
- [27] N. Asao, T. Shimada, T. Sudo, N. Tsukada, K. Yazawa, Y. S. Gyoung, T. Uyehara, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6274-6282.
- [28] D. Enders, T. Otten, *Synlett* **1999**, 747-749.
- [29] D. Enders, A. Adam, D. Klein, *Synlett* **2000**, 137-384.
- [30] S. Sulzer-Mossé, A. Alexakis, *Chem. Commun.* **2007**, 3123-3135.
- [31] Y. Takemoto, *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *58*, 593-601.
- [32] D. A. Evans, M. C. Willis, J. N. Johnston, *Org. Lett.* **1999**, *6*, 865-868.
- [33] D. A. Evans, T. Rovis, M. C. Kozlowski, C. W. Downey, J. S. Tedrow, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9134-9142.
- [34] D. A. Evans, K. A. Scheidt, J. N. Johnston, M. C. Willis, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4480-4491.
- [35] M. P. Sibi, *J. Chem. Org. Lett.* **2002**, *17*, 2933-2936.
- [36] M. D. Curtis, P. Beak, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2996-2997.
- [37] W. R. Roush, B. M. Lesur, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2231-2234.
- [38] W. R. Roush, M. R. Michaelides, F. D. Tai, B. M. Lesur, W. K. M. Chong, D. J. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2984-2995.
- [39] A. Bernardi, S. Cardani, T. Pilati, G. Poli, C. Scolastico, R. Villa, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1600-1607.
- [40] S. Hanessian, K. Sumi, *Synthesis* **1991**, 1083-1098.
- [41] A. Mengel, O. Reiser, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1191-12223.
- [42] A. S. Kireev, M. Manpadi, A. Kornienko, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2630-2640.
- [43] J. U. Nef, *J. Liebigs Ann. Chem.* **1894**, *280*, 263-291.
- [44] H. W. Pinnick, *Org. React.* **1990**, *38*, 655-792.
- [45] A. Hassner, J. M. Larkin, J. E. Dowd, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 1733-1739.
- [46] G. M. Barrett, G. G. Graboski, *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 751-762.
- [47] O. M. Berner, L. Tedeschi, D. Enders, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1877-1894.
- [48] M. Brenner, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **199**, *82*, 2365-2379.
- [49] E. Juaristi, A. K. Beck, J. Hanson, T. Matt, T. Mukhopadhyay, M. Simpson, D. Seebach, *Synthesis* **1993**, 1271-1290.
- [50] O. Diels, K. Alder, *Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98-122.
- [51] G. R. Delpierre, M. Lamchen, *Quart. Rev. Chem. Soc.* **1965**, *19*, 329-348.
- [52] J. J. Tufariello, *1,3-Dipolar Cycloadditions in Chemistry*, Wiley, New York, **1984**.
- [53] R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357-396.
- [54] R. Huisgen, W. Mack, *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 2805-2813.
- [55] C. Grundmann, *Synthesis* **1970**, 344-359.
- [56] C. Grundmann, J. M. Dean, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2809-2812.
- [57] S. Béha, D. Giguère, R. Patnam, R. Roy, *Synlett* **2006**, 1739-1743.

- [58] Y. Basel, A. Hassner, *Synthesis* **1997**, 309-312.
- [59] E. Dumez, A.-C. Durand, M. Guillaume, P.-Y. Roger, R. Faure, J.-M. Pons, G. Herbette, J.-P. Dulcère, D. Bonne, J. Rodriguez, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 12470-12488.
- [60] V. Nair, T. D. Suja, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *63*, 12247-12275.
- [61] A. Kamimura, T. Yoshida, H. Uno, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11081-11085.
- [62] A. Kadowaki, Y. Nagata, H. Uno, A. Kamimura, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1823-1825.
- [63] K. Ramachandiran, K. Karthikeyan, D. Muralidharan, P. T. Perumal, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3006-3009.
- [64] H. Rae Kim, H. Jin Kim, J. L. Duffy, M. M. Olmstead, K. Ruhlandt-Senge, M. J. Kurth, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4259-4262.
- [65] A. Hassner, W. Dahaen, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5505-5510.
- [66] L. Gottlieb, A. Hassner, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3759-3763.
- [67] S. Gao, Z. Tu, C.-W. Kuo, J.-T. Liu, C.-M. Chu, C.-F. Yao, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2851-2857.
- [68] L. Wirtz, *Diplomarbeit* **2008**, Universität Saarbrücken.
- [69] T. K. M. Shing, Y.-L. Zhong, *Synlett* **2006**, 1205-1208.
- [70] B. Mendler, *Dissertation* **2004**, Universität Saarbrücken.
- [71] F. L. Zumpe, U. Kazmaier, *Synlett* **1998**, 1199-1200.
- [72] F. L. Zumpe, U. Kazmaier, *Synthesis* **1999**, 1785-1791.
- [73] R. M. Beesley, C. K. Ingold, J. F. Thorpe, *J. Chem. Soc. Trans* **1915**, *107*, 1080-1084.
- [74] T. Böttcher, M. Pitschneider, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2740-2759.
- [75] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2010**, *110*, 2620-2640.
- [76] A. Miyawaki, A. Sawano, T. Kogure, *Nat Cell Biol.* **2003**, 1-7.
- [77] J. Deska, *Dissertation* **2007**, Universität Saarbrücken.
- [78] F. Heisig, *Dissertation* **2007**, Universität Bonn.
- [79] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Vol. 3*, Springer Verlag, **2006**.
- [80] N. G. Gubernator, H. Zhang, R. G. W. Staal, *Science* **2009**, *324*, 1441-1444.
- [81] U. Becherer, M. Pasche, S. Nofael, D. Hof, U. Matti, J. Rettig, *PLoS One* **2007**, *2*, e505.
- [82] E. M. Goldys, *Fluorescence Applications in Biotechnology and the Life Sciences*, Wiley Blackwell, **2009**.
- [83] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie: Eine Einführung, Vol. 2*, Wiley-VCH Verlag, **2000**.
- [84] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108-7133.
- [85] V. Podsadlowski, *Dissertation* **2004**, Universität Münster.
- [86] M. Sameiro, T. Goncalves, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190-212.
- [87] J. Petersen, *Dissertation* **2006**, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- [88] A. R. Katritzky, T. Narindoshvili, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 627-634.
- [89] J. B. Liu, X. H. Yang, X. X. He, K. M. Wang, *Sci China Chem* **2011**, *54*, 1157-1174.
- [90] C. Wang, X. Gao, X. Su, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1397-1415.
- [91] R. Kramer, *Dissertation* **2009**, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- [92] W. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107-3110.

-
- [93] B. M. Krasovitski, B. M. Bolotin, *Organic Luminescent Materials*, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft GmbH, **1988**.
- [94] A. N. Glazer, *Annu. Rev. Biochem.* **1970**, *39*, 101-130.
- [95] M. B. Francis, *Chemical Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [96] S. D. Tilley, N. S. Joshi, M. B. Francis, *The Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [97] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques, Vol. 1*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [98] J. M. Antos, M. B. Francis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 253-262.
- [99] J. M. McFarland, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490-13491.
- [100] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052-5053.
- [101] A. Dondoni, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9133-9135.
- [102] G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3646-3649.
- [103] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5226-5230.
- [104] P. Jonkheijm, D. Weinri, H. Engelkamp, P. C. M. Christianen, J. Kuhlmann, J. C. Maan, D. Nuesse, H. Schroeder, R. Wacker, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4493-4496.
- [105] T. Kodadek, I. Duroux-Richard, J. C. Bonnafous, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 210-217.
- [106] J. M. McFarland, N. S. Joshi, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7639-7644.
- [107] S. D. Tilley, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1080-1081.
- [108] H. B. F. Dixon, *J. Protein Chem.* **1984**, *3*, 99-108.
- [109] J. M. Gilmore, R. A. Scheck, A. P. Esser-Kahn, N. S. Joshi, M. B. Francis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5307-5311.
- [110] X. F. Li, L. S. Zhang, S. E. Hall, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4069-4073.
- [111] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
- [112] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Sci China Chem* **2010**, *53*, 61-70.
- [113] W. P. Jencks, J. Carriuolo, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1778-1786.
- [114] W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.
- [115] R. J. Griffin, *Prog. Med. Chem.* **1994**, *31*, 121-232.
- [116] I. E. Knaggs, *Nature* **1935**, *135*, 268-268.
- [117] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010.
- [118] H. Staudinger, L. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-636.
- [119] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
- [120] S. Diez-Gonzalez, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 166-178.
- [121] B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923-8930.
- [122] D. S. d. Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893-16899.
- [123] J. R. Johnson, *Org. React.* **1942**, *1*, 210-266.
- [124] R. L. Shriner, *Org. React.* **1942**, *1*, 1-37.

- [125] I. Yavari, R. Hekmat-Shoar, A. Zonouzi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2391-2392.
- [126] H. v. Pechmann, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1884**, 17, 929-936.
- [127] J. Van Gompel, G. B. Schuster, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1465-1468.
- [128] M. J. Uddin, L. J. Marnett, *Org. Lett.* **2008**, 10, 4799-4801.
- [129] S. Hashiguchi, A. Kawada, H. Natsugari, *Synthesis* **1992**, 403-408.
- [130] S. Frère, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2791-2794.
- [131] T. M. Kirrane, W. J. Middleton, *J. of Fluorine Chemistry* **1993**, 62, 289-292.
- [132] M. K. Potdar, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 9285-9287.
- [133] S. K. De, R. A. Gibbs, *Synthesis* **2005**, 8, 1231-1233.
- [134] R. S. Coleman, M. L. Madaras, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 5700-5703.
- [135] D. Seebach, E. Hungerbühler, R. Naef, P. Schurrenberger, B. Weidmann, M. Zuger, *Synthesis* **1982**, 138-141.
- [136] T. Besson, G. Coudert, G. Guillaumet, *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, 28, 1517-1522.
- [137] S. J. Strickler, R. Berg, *The Journal of Chemical Physics* **1962**, 37, 814-819.
- [138] R. F. Kubin, A. N. Fletcher, *Chem. Phys. Lett.* **1983**, 99, 49-52.
- [139] H. G. O. Becker, *Einführung in die Photochemie*, Vol. 3, Deutscher Verlag der Wissenschaft Berlin, **1991**.
- [140] C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, Vol. 2, VCH-Verlag, Weinheim, **1988**.
- [141] N. L. Thompson, T. P. Burghard, D. Axelrod, *Biophys J.* **1981**, 33, 435-454.
- [142] A. Merickel, P. Rosandich, D. Peter, R. H. Edwards, *Biol. Chem.* **1995**, 270, 25798-25804.
- [143] L. F. Tietze, T. Eicher, U. D. Diederichsen, A. Speicher, *Reactions and Syntheses in the Organic Chemistry Laboratory*, Wiley-VCH, **2007**.
- [144] S. Cacchi, E. Morera, G. Ortar, *Synthesis* **1986**, 320-322.
- [145] A. Luigi, E.-I. Negishi, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3111-3113.
- [146] K. Rurack, *Springer Ser Fluoresc* **2008**, 5, 101-145.
- [147] I. Jones, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 72, 391-395.
- [148] P. Wipf, Z. Wang, *Org. Lett.* **2007**, 9, 1605-1607.
- [149] Y. Liu, W. W. McWhorter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4240-4250.
- [150] A. Flohr, A. Aemissegger, D. Hilvert, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2633-2640.
- [151] J. Burkhart, *Dissertation* **2011**, Universität Saarbrücken.
- [152] K. Kacprzak, *Synlett* **2005**, 6, 943-946.
- [153] Lundquist, J. C. Pelletier, *Org. Lett.* **2001**, 3, 781-783.
- [154] Ahsanullah, P. Schmieder, R. Kühne, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5042-5045.
- [155] P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6029-6032.
- [156] M. Nakajima, J. P. Anselme, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 4421-4422.
- [157] R. A. Kusanur, M. V. Kulkarni, G. M. Kulkarni, S. N. Nayak, T. N. G. Row, K. Ganesan, C.-M. Sun, *J. Heterocycl. Chem.* **2010**, 47, 91-97.
- [158] N.-H. Ge, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 1228-1238.

-
- [159] M. Beller, C. Bolm, *Transition Metals for Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [160] B. M. Trost, D. L. V. Vranken, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **1996**, *96*, 395-422.
- [161] B. M. Trost, M. L. Crawley, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2003**, *103*, 2921-2943.
- [162] *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis, Vol. II*, Wiley Interscience, New York, **2002**.
- [163] E. Keinan, Z. Roth, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1769-1772.
- [164] E. Keinan, M. Sahai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 648-650.
- [165] D. J. Yee, V. Balsanek, D. Sames, in *PCT Int. Appl.*, **2006**.
- [166] T. N. Grant, F. G. West, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9348-9349.
- [167] J. J. Luche, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *10*, 2226-2227.
- [168] U. Kazmaier, F. L. Zumpe, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4067-4076.
- [169] F. Theil, *Enzyme in der organischen Synthese* Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg/Berlin/Oxford, **1997**.
- [170] U. Kazmaier, D. Stolz, K. Krämer, F. L. Zumpe, *Chemistry – A European Journal* **2008**, *14*, 1322-1329.
- [171] U. Kazmaier, F. L. Zumpe, *Angew. Chem.* **1999**, *38*, 1468-1470.
- [172] T. Wang, Y. Zhao, M. Shi, F. Wu, *Dyes Pigm.* **2007**, *75*, 104-110.
- [173] D. Becker, *Diplomarbeit* **2010**, Universität Saarbrücken.
- [174] U. Kazmaier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 998-999.
- [175] A. Siebum, W. Woo, J. Lugtenburg, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4664-4678.
- [176] K. Kacprzak, *Synlett* **2005**, 943-946.
- [177] F. Effenberger, J. Roos, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1085-1095.
- [178] Å. y. Jacobsen, H. Maekawa, N.-H. Ge, C. H. Gol`rbitz, P. Rongved, O. P. Ottersen, M. Amiry-Moghaddam, J. Klaveness, *J. Org. Chem.*, *76*, 1228-1238.
- [179] T. Wang, *Dyes Pigm.* **2007**, *75*, 104-110.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Uli Kazmaier danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung und dass er mir die Möglichkeit gab, innerhalb eines gesetzten Rahmens meine eigenen Ideen umsetzen zu können.

Herrn Prof. Dr. Theophil Eicher möchte ich für die spontane Bereitschaft, die Zweitkorrektur zu übernehmen, danken.

Ein ganz besonderer Dank verdienen meinen Laborkollegen Christian, Judith und Sarah. Sie waren in den Höhen und Tiefen des Laboralltages für mich da, haben mich unterstützt, haben mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und hatten immer ein paar aufbauende Worte für mich parat. Auch für die schöne Arbeitsatmosphäre und die gemeinsamen Stunden, in denen wir eine Menge Spaß und viel zu lachen hatten, möchte ich mich bedanken.

Daneben möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die schöne, abwechslungsreiche und vor allem lustige Zeit danken. Ich wünsche ihnen allen noch viel Erfolg und Durchhaltevermögen. Vor allem meinen Kollegen Angelika und Jens möchte ich für ihr offenes Ohr und ihre Unterstützung danken.

Mein Dank geht auch an unsere Festangestellten Rudi und Heike für die Messung zahlreicher CHN- und Massenproben. Ein besonderer Dank gilt Frau Harling, die eine schnelle und zuverlässige Messung der CHN-Proben ermöglichte, sowie Joachim und Thomas, die immer zur Stelle waren, wenn wieder etwas harkte und repariert werden musste.

Ich bedanke mich auch bei Prof. G. Jung, D. Auerbach und C. Spies für ihre Unterstützung auf dem Gebiet der Fluoreszenzspektroskopie. Weiter möchte ich mich bei Dr. U. Becherer und Prof. J. Rettig für die gute Zusammenarbeit und einen interessanten Einblick in die Physiologie bedanken.

Zuletzt möchte ich den Menschen danken, die das alles erst möglich gemacht haben, meinen Eltern, Großeltern und meinem Freund Henrik. Sie waren stets für mich da, haben mich unterstützt und aufgebaut.