

SYNTHESE UND PHOTOCHEMIE
VON
PHOTOAKTIVIERBAREN BIOMOLEKÜLEN

Dissertation

Vorgelegt von
Dipl.-Chem. Janina Schaal
aus Berlin

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Potsdam, August 2011

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Juni 2007 bis August 2011 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin unter der Betreuung von Prof. Dr. Pablo Wessig und Dr. Volker Hagen.

Gutachter: Prof. Dr. P. Wessig
Gutachter: Prof. Dr. M. Bienert
Gutachter: Prof. Dr. B. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2011

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/5792/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-57929](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-57929)
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-57929>

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Danksagungen..... | III |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| Abkürzungen für ausgewählte <i>Caging</i>-Gruppen und <i>Caging</i>-Reagenzien..... | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Vorbemerkungen..... | 1 |
| 1.2 Schutzgruppen | 1 |
| 1.3 Photolabile Schutzgruppen | 2 |
| 1.3.1 Überblick | 2 |
| 1.3.2 Schutzgruppen vom Nitrobenzyl-Typ..... | 4 |
| 1.3.3 Schutzgruppen vom Cumarin-Typ | 7 |
| 1.4 Photoaktivierbare inaktivierte Biomoleküle (<i>caged</i> Verbindungen) | 9 |
| 1.5 Übersicht über im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Biomoleküle | 11 |
| 1.5.1 Dopamin, Octopamin (Neurotransmitter) und Epinastin (Octopamin-Antagonist)..... | 11 |
| 1.5.2 Anisomycin und Emetin (Proteinsyntheseinhibitoren) | 15 |
| 1.5.3 Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (Protonophor) | 18 |
| 1.5.4 Bourgeonal (Riechstoff) | 18 |
| 2 Aufgabenstellung..... | 20 |
| 3 Ergebnisse und Diskussion | 23 |
| 3.1 Synthesen | 23 |
| 3.1.1 Vorbemerkungen..... | 23 |
| 3.1.2 <i>Caging</i> -Reagenzien | 25 |
| 3.1.2.1 (Cumarin-4-yl)methyl-Verbindungen..... | 25 |
| 3.1.2.2 Nitrobenzyl-Verbindungen | 29 |
| 3.1.3 Synthese der <i>caged</i> Verbindungen..... | 36 |
| 3.1.3.1 Aktivester..... | 36 |
| 3.1.3.2 <i>Caged</i> Neurotransmitter | 37 |
| 3.1.3.3 <i>Caged</i> PSIs | 44 |
| 3.1.3.4 <i>Caged</i> CCCP..... | 46 |
| 3.1.3.5 <i>Caged</i> Bourgeonal..... | 47 |
| 3.2 Eigenschaften der <i>caged</i> Verbindungen..... | 49 |
| 3.2.1 Löslichkeiten und Hydrolysestabilitäten | 49 |
| 3.2.2 Absorptionsspektroskopische Charakterisierung..... | 52 |
| 3.2.3 Mechanismus der Photospaltung und photochemische Quantenausbeuten | 60 |
| 3.2.4 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung | 67 |
| 3.2.5 pH-Abhängigkeit..... | 71 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2.6 | 2-Photonen-Photolyse | 73 |
| 3.2.7 | Photokinetische Untersuchungen | 74 |
| 3.3 | Biologische Untersuchungen | 77 |
| 3.3.1 | Anwendungen von <i>caged</i> Octopamin und <i>caged</i> Epinastin | 77 |
| 3.3.2 | Anwendungen der <i>caged</i> PSIs | 82 |
| 4 | Zusammenfassung und Ausblick | 89 |
| 5 | Experimenteller Teil | 94 |
| 5.1 | Physikalische Messgeräte | 94 |
| 5.2 | Chromatographische Methoden..... | 95 |
| 5.3 | Arbeitsweise, Lösungsmittel, Chemikalien und Substanzcharakterisierung | 96 |
| 5.4 | Allgemeine Synthesvorschriften..... | 99 |
| 5.5 | Spezielle Synthesvorschriften..... | 100 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 160 |
| 7 | Anhang | 171 |

Danksagungen

Mein ganz herzlicher Dank gilt Dr. V. Hagen für die interessante Themenstellung, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in allen Belangen. Durch seine aufgeschlossene und freundliche Betreuung, in der er mir viel Freiraum zur Bearbeitung meiner Aufgabenstellung und neuer Ideenansätze ließ, boten sich mir zahlreiche Möglichkeiten der Kooperation und Weiterentwicklung.

Bei Prof. Dr. P. Wessig (Universität Potsdam) möchte ich mich für seine Betreuung an der Universität Potsdam, viele hilfreiche Diskussionen und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Prof. Dr. M. Bienert (FMP) und Prof. Dr. B. Schmidt (Universität Potsdam) danke ich für ihre Unterstützung und die Übernahme der Gutachten.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Hagen-Arbeitsgruppe N. Kotzur, F. Kilic, D. Geissler und B. Dekowski für die gute Zusammenarbeit und ein tolles Arbeitsklima. Besonders N. Kotzur und F. Kilic standen mir immer mit hilfreichen Diskussionen und beim Vermitteln neuer Messmethoden zur Seite. Bei B. Dekowski möchte ich mich auch für ihre Unterstützung bei der Synthese bedanken.

Herrn Prof. Dr. R. Schmidt (Johannes-Wolfgang-Goehte-Universität Frankfurt am Main) danke ich für seine Unterstützung bei der Aufnahme und Auswertung der zeitaufgelösten fluoreszenzspektroskopischen Messungen.

Bei Prof. Dr. A. Barth (Stockholm University) möchte ich mich für die zeitaufgelösten IR-Spektroskopiemessungen bedanken.

Prof. Dr. D. Eisenhardt (FU Berlin) und ihrerer Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die sehr gute und interessante Zusammenarbeit und ihr Engagement bei der Evaluierung der Möglichkeiten, die sich mit dem Einsatz meiner *caged* Verbindungen als Werkzeuge für ihre biologischen Untersuchungen ergaben. Ein ganz besonders herzliches Dankeschön gilt ihrer Doktorandin K. Marter für eine sehr angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit im Labor und das Bestreben, mich als Chemiker zu verstehen und mir ihr biologisches Wissen zu vermitteln.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Wiesner und J. Eichhorst (FMP) die mittels ihres großen Erfahrungsschatzes, viel Kreativität und Mühe die Messungen in den Zellen ermöglichten und mich bei den Messungen der 2-Photonen-Quantenausbeuten unterstützten.

Mein Dank gilt auch:

- den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Beyermann (FMP) für Ihre kollegiale Zusammenarbeit und Hilfe beim Messen der ESI-MS-Spektren
- A. Horatscheck (FMP) für die HRMS-Messungen
- J. Preidl und P. Schmieder (FMP) für ihre Unterstützung bei allen NMR-Problemen
- R. Raz (FMP) für die Hilfe bei den IR-Messungen
- M. Dreißgacker (FMP) für Ihre große Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei N. Kotzur, M. Wetzel und E. Raab für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Ein großes Dankeschön geht natürlich an meine Familie und gute Freunde. Ohne Euer Verständnis und eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| Ac | Acetyl |
| AcOEt | Essigsäureethylester |
| AcOH | Essigsäure |
| Äq. | Äquivalent |
| ber. | berechnet |
| Boc | <i>tert</i> -Butoxycarbonyl |
| bs | breites Singulett |
| CCCP | Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon |
| CR | konditionierte Reaktion |
| CS | <i>conditioned stimulus</i> |
| Cum | Cumarin |
| d | Dublett |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| dest. | destilliert |
| dd | Doppeldublett |
| DIPEA | <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin |
| DMAP | 4-(Dimethylamino)pyridin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic acid</i> |
| dt | Doppeltriplett |
| ESI-MS | Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie |
| Fmoc | (Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl |
| gef. | gefunden |
| gesätt. | gesättigt |
| GFP | <i>Green fluorescence proteine</i> |
| Hela-S Zellen | Gebärmutterhals-Tumorzellen |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| HRMS | hoch aufgelöste Massenspektrometrie (<i>high-resolution mass spectrometry</i>) |
| IR | Infrarot |
| ISC | Interkombination (<i>intersystem-crossing</i>) |
| LM | Lösungsmittel |
| Lsg. | Lösung |
| m | Multiplett |
| Me | Methyl |
| n.b. | nicht bestimmt |

| | |
|----------------|---|
| NMO | <i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid |
| NMR | kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>) |
| PER | <i>proboscis extension response</i> |
| PG | Schutzgruppe (<i>protecting group</i>) |
| Ph | Phenyl |
| Piv | Pivaloyl |
| PPG | photolabile Schutzgruppe (<i>photoremovable protecting group</i>) |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| PPTS | Pyridinium- <i>p</i> -toluensulfonat |
| präp. | präparativ |
| PS | Proteinsynthese |
| PSI | Proteinsyntheseinhibitor |
| q | Quartett |
| R_f | Retentionsfaktor |
| t_R | Retentionszeit |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Singulett |
| S ₁ | erster angeregter Singulett-Zustand |
| SC | Säulenchromatographie |
| Schmp. | Schmelzpunkt |
| SET | Einelektronentransfer (<i>single electron transfer</i>) |
| t | Triplett |
| T ₁ | erster angeregter Triplett-Zustand |
| TAS-F | Tris(dimethylamino)sulfon-trimethylsilyldifluorid |
| TBDMSCl | <i>tert</i> -Butyl-dimethylsilylchlorid |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TMS | Trimethylsilyl |
| UR | unkonditionierte Reaktion |
| US | <i>unconditioned stimulus</i> |
| UV/Vis | ultraviolett/sichtbar |
| verd. | verdünnt |
| Zers. | Zersetzung |

Abkürzungen für ausgewählte *Caging*-Gruppen und *Caging*-Reagenzien

| | |
|-------------------|---|
| Bba | 1-(Chlormethyl)-9-methoxy-3-oxo-3 <i>H</i> -benzo-benzopyran |
| BBCMNP-ED | 1,2-Bis[4,5-bis(carboxymethoxy)-2-nitrophenyl]ethan-1,2-diol |
| BBMCMNP-ED | 1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethan-1,2-diol |
| BBHC-ED | {8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}ethan-1,2-diol |
| BBHCM | {8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}methyl |
| BBHCMOC | {8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}methoxycarbonyl |
| BCMAC-ED | {7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}ethan-1,2-diol |
| BCMACM | {7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl |
| BCMACMOC | {7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl |
| BDMNP-ED | 1,2-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1,2-diol |
| BHC-ED | (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)ethan-1,2-diol |
| BHCM | (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl |
| BHCMOC | (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl |
| BHQ | (8-Brom-7-hydroxychinolin-2-yl)methyl |
| CDNI | 4-(Carboxymethoxy)-5,7-dinitroindolin-1-yl |
| CM | (Cumarin-4-yl)methyl |
| CMOC | (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl |
| CNB | α -Carboxy-2-nitrobenzyl |
| DBHCM | [6-Brom-8-(diethylaminomethyl)-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl |
| DBHCMOC | [6-Brom-8-(diethylaminomethyl)-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl |
| DEACM | (7-Diethylaminocumarin-4-yl)methyl |
| DEACMOC | (7-Diethylaminocumarin-4-yl)methoxycarbonyl |
| Desyl | Desoxybenzoinyl |
| DMACM | (7-Dimethylaminocumarin-4-yl)methyl |
| DMCM | (6,7-Dimethoxycumarin-4-yl)methyl |
| DMNB | 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl |
| DMNBOC | 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyloxycarbonyl |
| DMNPE | 4,5-Dimethoxy-2-nitrophenylethyl |
| FPBHCM | {6-Brom-8-[4-[(fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]-(piperazin-1-yl)methyl]-7-hydroxycumarin-4-yl}methyl |
| MCM | (7-Methoxycumarin-4-yl)methyl |
| MNI | 4-Methoxy-7-nitroindolin-1-yl |
| NB | 2-Nitrobenzyl |
| NI | 7-Nitroindolin-1-yl |
| NPE | 1-(2-Nitrophenyl)ethyl |
| NPP | 2-(2-Nitrophenyl)propyl |
| NPPOC | 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl |
| PBHCM | {6-Brom-7-hydroxy-8-[(piperazin-1-yl)methyl]cumarin-4-yl}methyl |
| PBHCMOC | {6-Brom-7-hydroxy-8-[(piperazin-1-yl)methyl]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl |

| | |
|----------------|---|
| pHP | <i>p</i> -Hydroxyphenacyl |
| tBBHCM | {8-[Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}methyl |
| tBCMACM | {7-[Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl |

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkungen

Disziplinen der Lebenswissenschaften befassen sich in ihren Forschungen mit komplexen biologischen Systemen, wie z.B. Zellen, Membranen oder auch Rezeptoren, deren Funktionen verstanden und gegebenenfalls beeinflusst werden sollen. Hierfür bedienen sie sich verschiedener Möglichkeiten bzw. Werkzeuge. Zu diesen gehören photoaktivierbare inaktive Biomoleküle, sogenannte *caged* Verbindungen. Hierbei handelt es sich um Verbindungen, die durch Maskierung mit photoaktivierbaren Schutzgruppen biologisch unwirksam gemacht worden sind. Eingesetzt werden diese Verbindungen dann in dem zu untersuchenden System, indem nach Applikation und Verteilung am Zielort durch Einwirkung von Licht das gewünschte Biomolekül in Bruchteilen von Sekunden am Ort der Bestrahlung freigesetzt wird und seinen Einfluss auf das ausgesuchte biologische System offenbaren kann.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von *caged* Verbindungen und deren Einsatz bei der Aufklärung von biologischen Fragestellungen. Hierzu wird zunächst ein kurzer Überblick zur Schutzgruppenthematik und die im Rahmen der Arbeit untersuchten Biomoleküle gegeben.

1.2 Schutzgruppen

Schutzgruppen (PGs, *protecting groups*) sind Strukturen, die bestimmte Funktionen eines Moleküls blockieren und damit unerwünschte Reaktionen verhindern. Sie können unter verschiedenen Reaktionsbedingungen wieder entfernt werden und dadurch die geschützten funktionellen Gruppen wieder freisetzen.¹ Die Wahl geeigneter Schutzgruppen ist eine entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung anspruchsvoller Synthesen, da man komplexe Zielverbindungen nur mit einer Synthesestrategie erhält, welche die effiziente Abfolge geeigneter, (regio)selektiver Transformationen ermöglicht. Die Schutzgruppen, welche verschiedene funktionelle Gruppen an Syntheseintermediaten für einzelne oder mehrere Syntheseschritte maskieren, beeinflussen Länge und Effizienz einer Synthese und sind oft der Grund für Erfolg oder Scheitern einer Synthesestrategie.² Es existiert zwar eine Vielzahl von Schutzgruppen^{1b,3} für unterschiedlichste funktionelle Gruppen, allerdings liegen die Probleme in der Synthese oft in der Kombination verschiedener PGs bzw. deren selektiver Abspaltung, ohne Nebenreaktionen zu verursachen.² Somit ist neben der Planung der Synthesestrategie mit effizienten Synthesemethoden und Reagenzien auch eine angepasste Schutzgruppenstrategie wichtig, die die Labilität der Syntheseintermediate und Stabilität der PGs gegenüber den eingesetzten Reagenzien berücksichtigt.

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten um PGs abzuspalten, welche auf chemischen, elektrochemischen, enzymatischen und photochemischen Methoden beruhen.

1.3 Photolabile Schutzgruppen

1.3.1 Überblick

Durch Licht abspaltbare PGs werden als photolabil oder photoaktivierbar bezeichnet. Beim Einsatz von photoaktivierbaren PGs (PPGs, *photoremovable protecting groups*) sind außer dem für die Photolyse benötigten Licht keine anderen Reagenzien nötig. Vorteile des Lichts gegenüber chemischen Reagenzien sind, dass es homogen in das Reaktionsvolumen eingestrahlt werden und dass gegebenenfalls durch moderne Lasertechnik eine hohe Lichtdosis in sehr kurzer Zeit zur Anwendung kommen kann. Der Einsatz von PPGs in der Synthese neben anderen PGs, welche durch Säuren, Basen oder Oxidations-/Reduktionsmittel abgespalten werden, ermöglicht zudem eine orthogonale Abspaltung. Somit sind PPGs ein gutes Werkzeug bei Synthesen, in denen der Einsatz verschiedener PGs nebeneinander nötig ist. Der Einsatz von Licht kann sowohl räumlich als auch zeitlich gesteuert werden und führt mit starken Lichtquellen zu einer effizienten Photolyse und sehr schnellen Photospaltungen. Somit sind PPGs auch wichtige Werkzeuge beim Maskieren von Biomolekülen, um schnelle biologische Prozesse zu untersuchen.^{3b,4} In diesen Fällen spricht man von ‚Caging-Gruppen‘ für die PPGs bzw. *caged compounds* oder *caged Verbindungen* für die maskierten Biomoleküle. Inzwischen existieren verschiedene PPGs die mit Licht der Wellenlängen 330-420 nm abgespalten werden, was den Einsatz der PPGs in biologischen Systemen sehr attraktiv macht. Von BOCHET *et al.* und KOTZUR *et al.* gibt es auch erfolgversprechende Studien für den gleichzeitigen Einsatz verschiedener PPGs nebeneinander, die durch Licht verschiedener Wellenlänge orthogonal abgespalten werden können.⁵ Insgesamt finden PPGs Anwendung in der präparativen organischen^{1a,6} und kombinatorischen Chemie,⁷ in der Photolithographie^{4d,8} und in der Biochemie.^{4a-c,9}

Der erste publizierte Einsatz einer PPG stammt von BARLTROP und SCHOFIELD aus dem Jahr 1962.^{3b} Die Aminosäure Glycin wurde an der Aminofunktion mit dem Benzyloxycarbonyl-Rest geschützt und durch Photolyse bei 254 nm wieder freigesetzt. Seitdem ist eine Vielzahl von PPGs, die auf verschiedenste Problemstellungen bzw. Anforderungen zugeschnitten sind, entwickelt worden.^{4a-c,9b,c,10}

Abbildung 1-1 gibt eine Übersicht über verschiedene erfolgreich eingesetzte PPGs. Die aufgeführten Nitrobenzyl- und Cumarinylmethyl-Schutzgruppen, die unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, werden in den Kapiteln 1.3.2 und 1.3.3 ausführlich diskutiert.

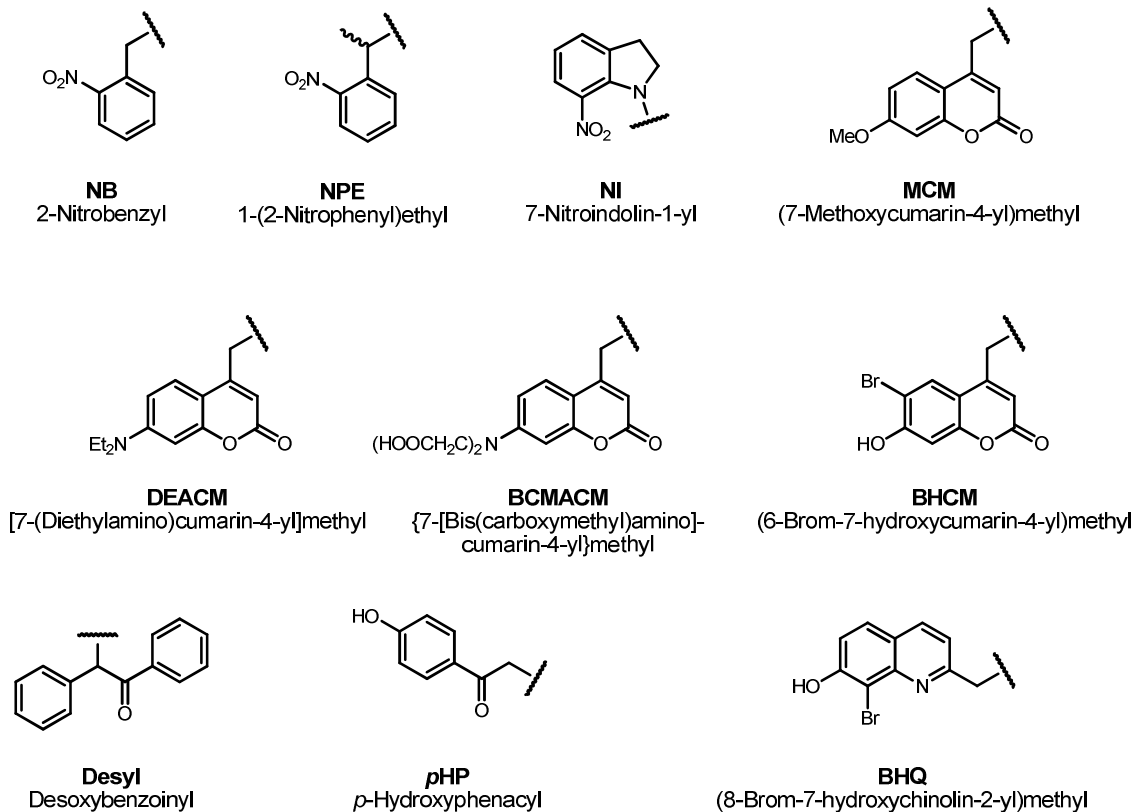


Abbildung 1-1: Photolabile Schutzgruppen.

Die in Abbildung 1-1 gezeigte **Desyl**-Gruppe wurde von SHEEHAN *et al.* als PPG für Carbonsäuren eingeführt.¹¹ **Desyl**-PPGs zeigen hohe Quantenausbeuten und schnelle Freisetzungsraten, sind aber schlecht wasserlöslich und besitzen nur eine geringe Toleranz gegenüber Strukturmodifikationen.^{11a} Außerdem absorbieren **Desyl**-Chromophore relativ schlecht im langwelligen UV-Bereich.

Caged Verbindungen mit **pHP**-PPGs¹² sind relativ gut wasserlöslich, besitzen ziemlich hohe photochemische Quantenausbeuten sowie schnelle Freisetzungsraten und das bei der Photospaltung entstehende Nebenprodukt, *p*-Hydroxyphenylelessigsäure, ist ungiftig und sein Absorptionsspektrum ist zu dem der PPG hypsochrom verschoben. Aber alle **pHP**-geschützten Verbindungen besitzen nur kleine Extinktionskoeffizienten im Wellenlängenbereich oberhalb von 320 nm, was die Photoeffizienz in diesem Bereich stark einschränkt.

Die **BHQ**-Gruppe und Derivate davon wurden von DORE *et al.* als PPGs für Carbonsäuren eingeführt.¹³ **BHQ**-geschützte Verbindungen weisen hohe photochemische Quantenausbeuten und kleine Fluoreszenzquantenausbeuten auf, allerdings sind auch hier die Extinktionskoeffizienten im langwelligen UV-Bereich relativ gering.

1.3.2 Schutzgruppen vom Nitrobenzyl-Typ

Die **NB**-PPG ist weit verbreitet und gilt als gut untersucht.^{4b} Sie wurde zum ersten Mal 1966 von BARLTROP *et al.* beschrieben, welche berichteten, dass die Photolyse von 2-Nitrobenzylestern zur Rückbildung der freien Carbonsäuren und Freisetzung einer 2-Nitrosocarbonyl-Verbindung führt.¹⁴

In der Folge wurden viele Derivate der **NB**-PPG hergestellt und erfolgreich eingesetzt. Ein großer Vorteil von **NB**-PPGs ist die kommerzielle Verfügbarkeit der entsprechenden Einführungsreagenzien.^{10a} **NB**-PPGs wurden zum Schützen von Säuren,^{4b,14} Aminen,¹⁵ Alkoholen,¹⁶ Thiolen¹⁷ und Carbonylverbindungen¹⁸ eingesetzt. Auch als photolabile Linker in Festphasensystemen¹⁹ und als PPGs in der DNA-Chip-Synthese²⁰ finden verschiedene **NB**-Derivate Anwendung. In Abbildung 1-3 sind einige weitere erfolgreich eingesetzte **NB**-PPGs aufgezeigt.

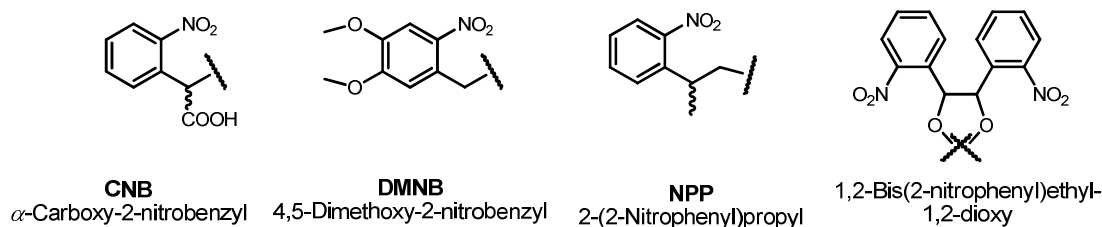


Abbildung 1-3: Wichtige **NB**-PPGs.

Nachteile beim Einsatz von **NB**-PPGs sind die als Photolyseprodukte entstehenden 2-Nitrosocarbonyl-Verbindungen (vgl. Abbildung 1-4), welche bei Freisetzung in biologischen Systemen toxisch wirken können und außerdem unübersichtliche Folgereaktionen zu sekundären Photoprodukten eingehen. Letztere absorbieren Licht im gleichen Wellenlängenbereich wie die **NB**-PPGs, was nachteilig für die photolytische Spaltung ist. Die Bildung dieser sekundären Photoprodukte kann durch Zugabe von Abfangreagenzien, wie z.B. Thiosemicarbazid, weitgehend unterdrückt werden. Da die Freisetzung der geschützten Moleküle im Millisekundenbereich liegt, eignen sich **NB**-PPGs nicht zur Untersuchung sehr schneller biologischer Prozesse. Trotz geringer Extinktionskoeffizienten im Wellenlängenbereich oberhalb von 300 nm ist die Photospaltung bei **NB**-geschützten Verbindungen ausreichend effektiv.

Der Photolysemechanismus bei **NB**-geschützten Verbindungen ist in Abbildung 1-4 aufgeführt.²¹

Der Mechanismus startet nach der Anregung durch UV-Licht mit einer Photoredoxreaktion. Anschließend findet eine intramolekulare 1,5-Wasserstoff-Verschiebung statt, was die *aci*-Nitro-Zwischenstufe zur Folge hat. Diese cyclisiert zum Benzisoxazol, welches dann durch Ringöffnung zu einem Hemiacetal umlagert und abschließend unter Abspaltung einer 2-Nitrosocarbonyl-Verbindung zur entschützten Verbindung HX führt.

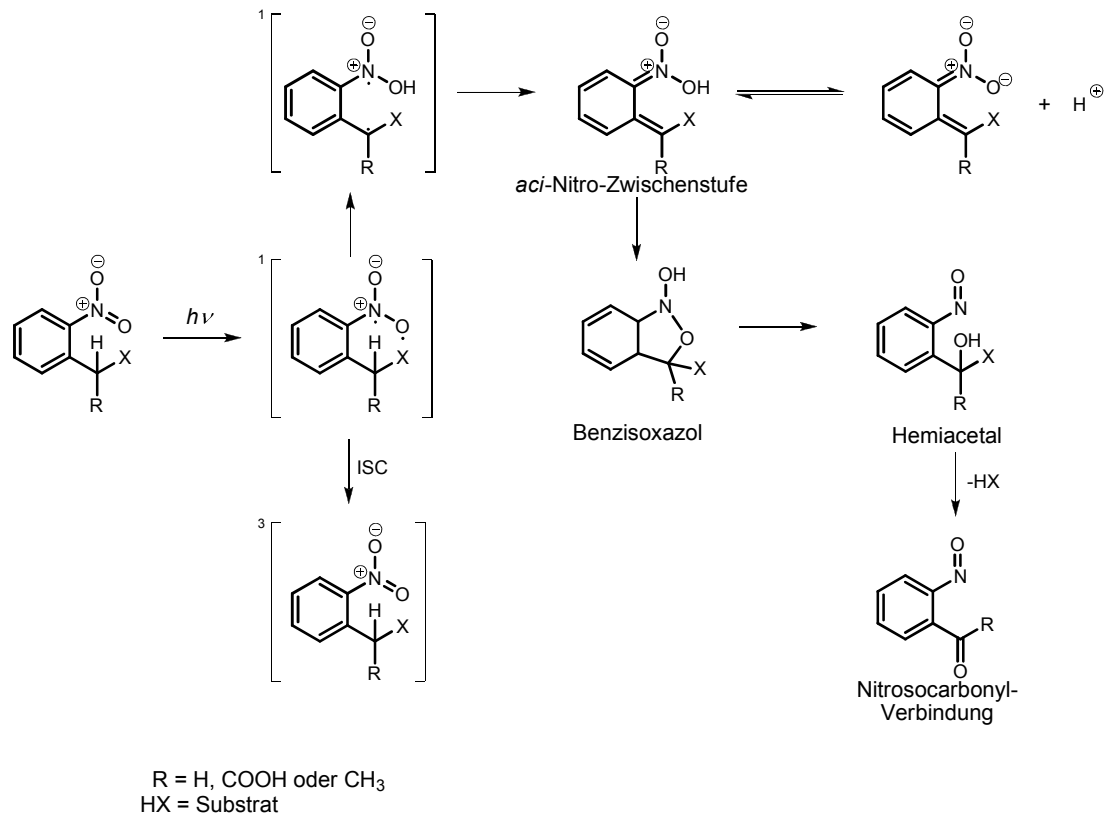


Abbildung 1-4: Mechanismus der Photospaltung von 2-Nitrobenzyl-Verbindungen.²¹

Durch Einführung von Substituenten mit Elektronendonator-Eigenschaften wie z.B. Methoxy-Gruppen am aromatischen Ring, kann das langwellige Absorptionsmaximum bathochrom verschoben werden. Die führt zu der sehr häufig eingesetzten 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl-PPG (**DMNB**).²² Die zusätzliche Einführung einer Carboxy-Gruppe in die α -Position des **NB**- und des **DMNB**-Restes hat einen positiven Einfluss auf die Quantenausbeute und die Löslichkeit der PPG.²³ Das Vorhandensein einer Methylgruppe in der α -Position der **NB**-Gruppierung führt zu den **NPE**-Derivaten (Abbildung 1-1).²⁴ **NPE**-geschützte Verbindungen werden photolytisch schneller gespalten als **NB**-Derivate und bei der Photoreaktion entsteht ein weniger toxisches Nitrosoketon.

Um schädliche Effekte der 2-Nitrosocarbonyl-Verbindung zu vermeiden, kann alternativ die von PFLEIDERER *et al.* eingeführte und in Abbildung 1-3 gezeigte 2-(2-Nitrophenyl)propyl- (**NPP**) bzw. 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl-Gruppe (**NPPOC**) eingesetzt werden. Die Photolyse verläuft hier nach einem anderen Mechanismus und es wird Nitrostyrol als Photolyseprodukt gebildet.²⁵

Als **NB**-Schutzgruppenreagenz für Carbonylverbindungen führten HÉBERT und GRAVEL 1974 das (2-Nitrophenyl)ethan-1,2-diol ein,²⁶ welches mit dem Substrat in der Gegenwart von PPTS zu einer photolabil geschützten Verbindung, dem (2-Nitrophenyl)-substituierten 1,3-Dioxolan, umgesetzt wurde (Abbildung 1-5). Bei Bestrahlung der geschützten Carbonylverbindung mit Licht entstanden α -Hydroxy-*o*-nitrosoacetophenon und die entschützte Carbonylverbindung.

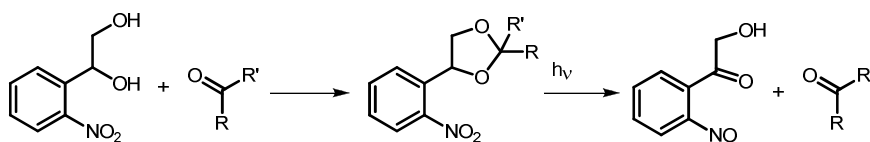


Abbildung 1-5: Synthese und Photolyse von 2-Nitrophenyl-substituierten 1,3-Dioxolanen.

(2-Nitrophenyl)ethan-1,2-diol setzte GRAVEL 1983 für die Maskierung verschiedener Biomoleküle mit Carbonylfunktion ein.^{26b} BLANC *et al.* entwickelten 2002 1,2-Bis(2-nitrophenyl)ethan-1,2-diol als Schutzgruppen-Reagenz für Carbonylfunktionen mit deutlich besseren photochemischen Eigenschaften.^{18a} Um die Schutzgruppe weiter zu verbessern, führten KANTEVARI *et al.* zusätzlich vier Methoxysubstituenten an den Aromaten ein.^{18b}

In den letzten Jahren wurden auch PPGs für Carbonylfunktionen, die auf dem Salicylalkohol-Chromophor basieren, entwickelt.²⁷ Dabei handelt es sich jedoch um stark hydrophobe Verbindungen, so dass ihr Einsatz unter physiologischen Bedingungen nur äußerst begrenzt möglich ist. Ausserdem weisen die Verbindungen relativ geringe Extinktionskoeffizienten auf.

Die 1981 von PASS *et al.* eingeführte 7-Nitroindoliny-PPG (**NI**, Abbildung 1-1)²⁸ wurde als PPG für Amine, Alkohole und Carbonsäuren eingesetzt.^{21e,29} Der **NI**-Chromophor absorbiert relativ langwellig. Weitere entwickelte Derivate der **NI**-Schutzgruppe absorbieren zwar auch langwellig, besitzen aber durch kleine Extinktionskoeffizienten relativ schlechte Photoeffizienzen. Somit eignen sich *caged* Verbindungen mit diesem Chromophor ausschließlich in Systemen, bei denen nur geringe Konzentrationen des Biomoleküls freizusetzen sind bzw. lange Photolysezeiten oder hohe Lichtintensitäten eingesetzt werden können.

1.3.3 Schutzgruppen vom Cumarin-Typ

(Cumarin-4-yl)methyl(**CM**)-Chromophore zeigen als photolabile Schutzgruppen ein hohes Potential für biologische Anwendungen, da sie über hohe Extinktionskoeffizienten verfügen, verhältnismäßig langwellig absorbieren und offenbar keine toxischen Wirkungen auf biologische Systeme hervorrufen. Das führte dazu, dass **CM**-PPGs oft in biologischen Studien Anwendung fanden.

Der erste Einsatz eines **CM**-Chromophors als PPG wurde 1984 von GIVENS *et al.* beschrieben (Abbildung 1-6). Die Autoren bestrahlten [(7-Methoxycumarin-4-yl)methyl]diethylphosphat mit Licht der Wellenlänge 360 nm und erhielten Diethylphosphat und 4-(Hydroxymethyl)-7-methoxycumarin (**MCM-OH**).³⁰

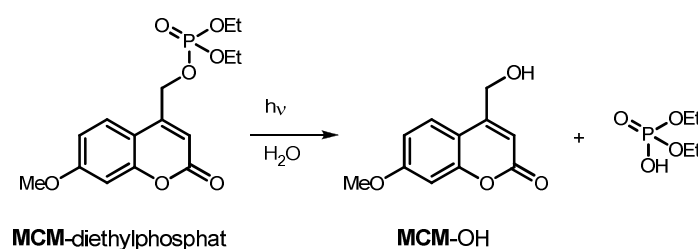
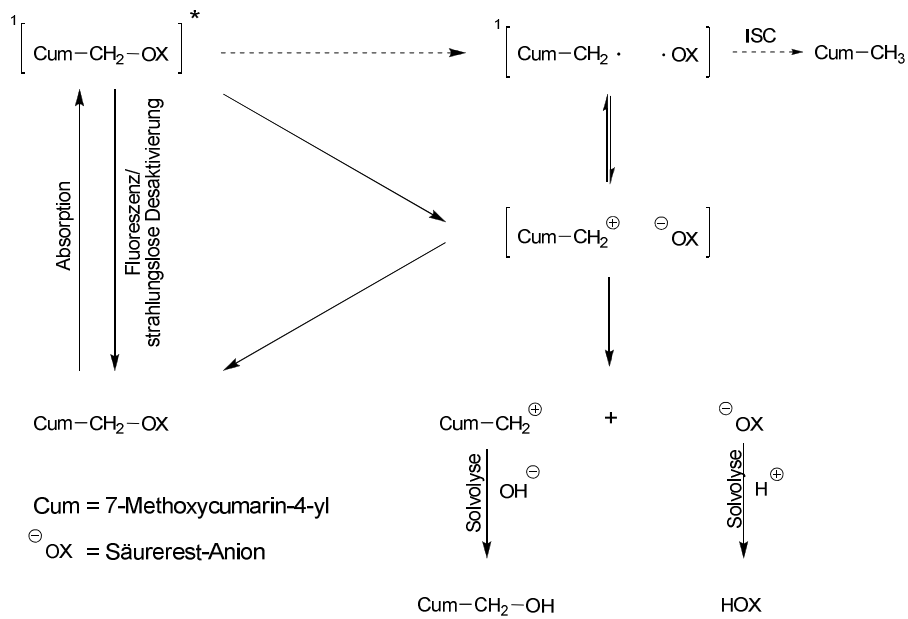


Abbildung 1-6: Photolyse von **MCM**-diethylphosphat.

Später entwickelte der Arbeitskreis um HAGEN die sehr effizienten und langwellig anregbaren [7-(Dimethylamino)cumarin-4-yl]methyl(**DMACM**)-³¹ [7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]methyl(**DEACM**)-³² und {7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl(**BCMAMC**)-PPGs.³³ Letztere PPG zeichnet sich zusätzlich durch eine sehr gute Wasserlöslichkeit aus. Die von FURUTA *et al.* eingeführte (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl(**BHCM**)-PPG³⁴ besitzt ebenfalls sehr gute photochemische und photophysikalische Eigenschaften, ist jedoch in wässrigen Pufferlösungen nur eingeschränkt löslich und zeigt nur bei pH-Werten >7 langwellige Absorptionsmaxima. **DMACM**-, **DEACM**-, **BCMAMC**- und **BHCM**-geschützte Verbindungen können auch durch 2-Photonen-Anregung gespalten werden.^{9c,33-35}

CM-PPGs wurden zum Schutz von Säuren^{30,34,35b,c,36} und in Form der (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl-PPGs auch zum Schutz von Aminen,^{34,35b,36b,37} Alkoholen^{23b,35b,36b,38} und Thiolen^{5d,35b,39} eingesetzt. 2003 verwendeten DORE *et al.* 6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin als Reagenz für die Überführung von Aldehyden und Ketonen in *caged* Verbindungen mit Dioxolan-Struktur.⁴⁰ Leider weisen diese Dioxolan-Verbindungen relativ geringe photochemische Quantenausbeuten und schlechte Löslichkeiten in wässrigen Medien auf. Das macht sie für Anwendungen unter physiologischen Bedingungen nur eingeschränkt einsetzbar.

Der Photolysemechanismus von (7-Methoxycumarin-4-yl)methyl-geschützten Säuren wurde 1999 von SCHADE *et al.* aufgeklärt (siehe Abbildung 1-7) und ergab, dass es sich um eine lösungsmittelunterstützte Photoheterolyse handelt.^{36a}


 Abbildung 1-7: Photolysemechanismus von **MCM**-Estern.^{36a}

CM-PPGs zeigen eine Photospaltung im ns-Bereich.^{32,41} Die abgespaltenen (Cumarin-4-yl)methyl-Alkohole besitzen teilweise starke Fluoreszenzen, die als Indikator für den Ort und die Menge des freigesetzten Substrats genutzt werden können.⁴² Ein weiterer Vorteil der **CM**-PPGs ist, dass viele der genannten Eigenschaften von den Substituenten am **CM**-Gerüst abhängig sind und so individuell auf spezifische Anforderungen zugeschnitten werden können.

1.4 Photoaktivierbare inaktivierte Biomoleküle (*caged* Verbindungen)

Mit PPGs maskierte Biomoleküle (*caged* Verbindungen) sind in den letzten Jahren wichtige Werkzeuge für zeitlich und räumlich aufgelöste Analysen von zellphysiologischen Prozessen geworden. Die in diesem Zusammenhang benutzten Begriffe *caged compounds* bzw. *caging groups* führte KAPLAN 1978 ein, als er erstmals ein photoaktivierbares inaktiviertes Biomolekül, **NB-caged** ATP, in einem biologischen System einsetzte.^{24a} In *caged* Verbindungen ist die pharmakophore Gruppierung des Biomoleküls durch eine PPG so verändert, dass sie ihre Funktion nicht mehr ausüben kann. Als Folge wird die *caged* Verbindung inaktiv. Setzt man das Biomolekül mit räumlich und zeitlich gesteuerten Lichtimpulsen wieder frei, wie schematisch in Abbildung 1-8 dargestellt, übt es seine Wirkung sofort wieder aus.

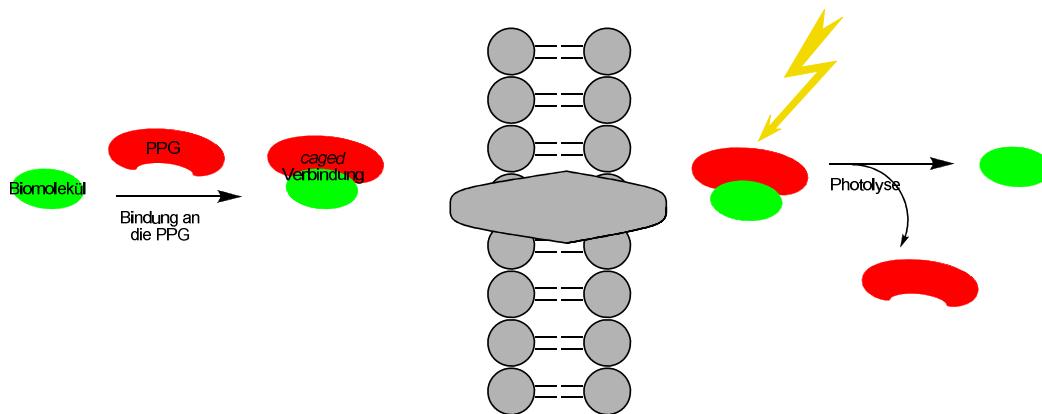


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der Synthese und Photolyse einer *caged* Verbindung.

Die experimentellen Möglichkeiten, die sich durch den Einsatz von *caged* Verbindungen ergeben, sind sonst nur schwer oder gar nicht zu realisieren. Durch den Einsatz von Photolampen oder Lasern kann punktgenau und sehr schnell auch innerhalb von Zellen eine relativ große Menge eines Biomoleküls freigesetzt werden. Diese mit Licht gesteuerten Konzentrationssprünge biologisch aktiver Verbindungen lassen sich so elegant mit keiner anderen Methode erreichen. Ein wichtiger Anspruch maßgeschneiderter *caged* Verbindungen ist die schnelle Photospaltung, die schneller ablaufen muss als der zu untersuchende biologische Prozeß. Um Schäden durch UV-Licht zu minimieren und gleichzeitig auch die Eindringtiefe des Lichts in Gewebsschichten zu erhöhen, wurden *caged* Verbindungen entwickelt, die durch IR-Licht (2-Photonen-Anregung) photolysiert werden können.^{9c,13a,33-34} Die Freisetzung der Biomoleküle durch hochfokussierte IR-Laserimpulse eröffnet in vielen Fällen erst die Möglichkeit die *caged* Verbindungen auch in Geweben einzusetzen.

Heute finden photolabile maskierte Biomoleküle von intrazellulären Botenstoffen, Neurotransmittern, diversen Pharmaka und anderen verschiedenste biochemische und zellbiologische Einsatzgebiete. Es gibt Beispiele bei denen *caged* Verbindungen bei der Regulation von Enzymaktivitäten,⁴³ bei der Genexpression,⁴⁴ bei Studien von Signaltransduktionsmechanismen⁴⁵ und bei der Synthese von

Biochips^{8b,46} Anwendung finden. *Caged* Derivate wurden von Ca^{2+} ,⁴⁷ Neurotransmittern,^{23a,48} Inositolen,⁴⁹ Nucleotiden,^{24a,32-33,50} Peptiden,⁵¹ Enzymen,⁵² mRNA⁵³ und DNA^{46,54} eingeführt.

Bei der Entwicklung von *caged* Verbindung sind verschiedene Kriterien zu beachten. Zunächst muss das maskierte Biomolekül in dem biologischen System inaktiv sein. Ferner sollte die geschützte Verbindung eine möglichst große Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen aufweisen und natürlich unter diesen Bedingungen ausreichend stabil sein, damit das Biomolekül erst an dem Einsatzort zur definierten Zeit durch Licht freigesetzt wird und nicht schon vorher durch Hydrolyse der *caged* Verbindung. Bei bestimmten Fragestellungen ist eine Membrangängigkeit des maskierten Biomoleküls erforderlich. Sehr wichtige Parameter bei der Auswahl der einzusetzenden Chromophore sind hohe Extinktionskoeffizienten bei $\lambda > 320$ nm und hohe photochemische Quantenausbeuten. Die nach der Photolyse erhaltenen Abspaltungsprodukte sollten keine toxischen Auswirkungen auf Zellen haben und eine möglichst geringe Absorption in dem Bereich des Absorptionsmaximums der *caged* Verbindung besitzen. Da viele der zu untersuchenden biologischen Prozesse in dem μs - bis s -Bereich ablaufen, ist eine schnelle und vollständige Freisetzung der Biomoleküle, möglichst in ns- bis μs -Bereich, ein wichtiges Kriterium. *Caged* Verbindungen sollten idealerweise auch durch 2-Photonen-Anregung gespalten werden können.

Wenn man sich die Untersuchungen betrachtet, bei denen *caged* Biomoleküle eingesetzt wurden, stellt man fest, dass es eigentlich keine *caged* Verbindung gibt, die allen oben aufgeführten Anforderungen gerecht wird. Viele haben eine zu geringe Photoeffizienz, zeigen eine zu langsame Freisetzung des Biomoleküls, bilden toxische Photolyseprodukte, sind nicht hydrolysestabil unter physiologischen Bedingungen oder sind in viel zu geringen Konzentrationen in wässrigen Medien löslich. Daher ist die Entwicklung neuer PPGs bzw. die Weiterentwicklung bestehender PPGs für unterschiedlichste Biomoleküle und Anwendungen notwendig. *Caged* Verbindungen sind ein immer gefragteres Werkzeug in der Biochemie und Biophysik.

1.5 Übersicht über im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Biomoleküle

1.5.1 Dopamin, Octopamin (Neurotransmitter) und Epinastin (Octopamin-Antagonist)

Zahlreiche *caged* Verbindungen von Neurotransmittern wurden bisher synthetisiert und bereits häufig erfolgreich eingesetzt. So wurden *caged* Verbindungen von Glutamat,^{34,55} γ -Aminobuttersäure (GABA),^{23d,55-56} Phenylephrin,⁵⁷ Dopamin,⁵⁸ Glycin,^{55c,59} Alanin,^{59a} β -Alanin,^{59a,60} 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA)⁶⁰ und Carbamoylcholin^{48a,b} beschrieben. Als Chromophore wurden zunächst der **NB**-, **DMNP**- und **NPE**-Rest eingesetzt.^{49b,50a,57b,59c,61} Später wurden meist der **CNB**-, **MNI**-, **BHC**- und auch der **DEACM**-Chromophor verwendet.^{34,48c,55-56,57b,59b,c} Kürzlich wurden mit Noradrenalin^{35b} und GABA⁶² auch Neurotransmitter in **BCMCM**-Derivate überführt und 2010 wurde von SALIERNO *et al.* mit dem in Abbildung 1-9 gezeigten Ruthenium-bipyridin-Komplex von Glutamat ein interessanter völlig neuer Typ von *caged* Verbindungen vorgestellt.⁶³

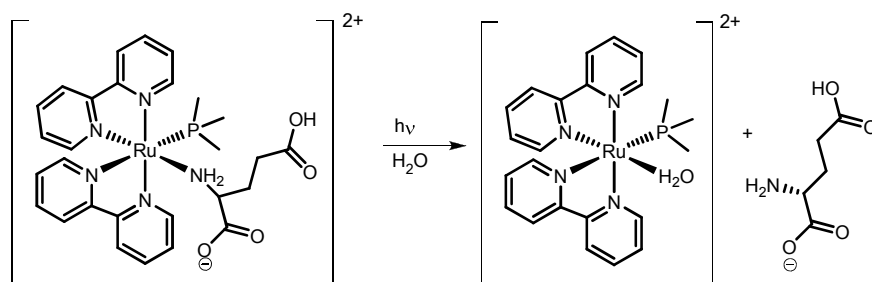


Abbildung 1-9: Struktur und Photolyse von $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PMe}_3)(\text{Glu})]^{2+}$.^{63a}

Der Vorteil der **CM**-*caged* Verbindungen liegt neben der ausgezeichneten Extinktion im langwelligen UV-Bereich vor allem in der Empfindlichkeit gegenüber einer 2-Photonen-Anregung. Für das von FURUTA *et al.* eingeführte **BHCMOC**-*caged* Glutamat wurde z.B. eine 2-Photonen-Quantenausbeute von 0,95 GM (GM = Göppert-Mayer) gefunden.

Abzuwarten bleibt der Nutzen der Ruthenium-bipyridin-Komplexe. Für das entsprechende *caged* Glutamat wurden ein hoher Extinktionskoeffizient bei $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ und eine sehr schnelle Freisetzung innerhalb von $50 \mu\text{s}$ beschrieben. Allerdings sind die 1- und 2-Photonen-Quantenausbeuten mit 0,001 bzw. 0,14 GM vergleichsweise mäßig.

An den verschiedenen aktuellen Publikationen mit *caged* Neurotransmittern zeigt sich, wie interessant diese Werkzeuge für Untersuchungen komplexer Mechanismen im zentralen Nervensystem (ZNS) sind. Jedoch stellt sich immer wieder heraus, dass viele der eingeführten *caged* Verbindungen bezüglich ihrer Eigenschaften nicht optimal sind. Deshalb ist die Suche nach neuen *caged* Neurotransmittern mit verbesserten Eigenschaften nach wie vor aktuell.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Phototrigger der Neurotransmitter Octopamin, Dopamin und Epinastin entwickelt, welche im Arbeitskreis von D. EISENHARDT (FU Berlin) eingesetzt werden sollen. Nachfolgend werden die Biomoleküle näher beschrieben.

D,L-Octopamin

Bei dem biogenen Amin Octopamin (Struktur siehe Kapitel 2, Abbildung 2-1) handelt es sich um einen Neurotransmitter, der bei der Steuerung von komplexen Verhaltensmustern bei wirbellosen Tieren (Invertebraten)⁶⁴ wie dem Sozialverhalten, dem Biorhythmus, dem Fluchtverhalten und dem Lernverhalten bzw. der Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle spielt. So wurde entdeckt, dass Octopamin als Neurotransmitter für die Motorik bei Heuschrecken verantwortlich ist⁶⁵ und bei bestimmten Formen des Lernens und der Gedächtnisbildung in Hummern⁶⁶ und Honigbienen, *Apis mellifera*,⁶⁷ von Bedeutung ist. Besonders die Studien in der Honigbiene^{67a,68} zeigen den Einfluss des Octopamins auf die empfindlichen Rezeptoren an sensorischen und motorischen Neuronen im ZNS und somit seine Effekte bei komplexen Verhaltensreaktionen.

In Wirbeltieren (Vertebraten) spielt Octopamin offenbar keine physiologische Rolle.^{64,69} Da aber Noradrenalin das monohydroxylierte Derivat vom Octopamin ist, gibt es Vermutungen, dass das octopaminerge System in Invertebraten funktionell dem adrenergen System in Vertebraten entspricht.⁷⁰

In vielen Arbeiten wird gezeigt, dass physiologische Verhaltensreaktionen der Signalwirkung des Octopamins zugeordnet werden müssen.^{64,71} In Untersuchungen zum olfaktorischen Lernen wird das *proboscis extension response* (Ausfahren des Rüssels als Antwort auf bestimmte Reize, PER) als Paradigma für das Lernen der Honigbiene benutzt.^{67b,72} Bei dieser klassischen Konditionierung,⁷³ wird der Biene erst ein Duft (*conditioned stimulus*, CS) präsentiert und kurz danach werden ihre Antennen mit Zucker stimuliert (*unconditioned stimulus*, US), was zu einer unkontingierten Reaktion (UR), in diesem Fall PER (Ausfahr ihres Rüssels), führt und somit zur Belohnung durch Aufnahme des Zuckers. Ziel ist es, dass die Biene lernt den Geruch mit der Zuckergabe zu assoziieren und in Wiederholungen als konditionierte Reaktion (CR) auch PER zeigt. Bei entsprechenden Untersuchungen reagierten 80 % der Bienen schon nach einem Experiment auf den Duft mit PER und es wurde ein Neuron (VUM_{mx1}) identifiziert, welches den US bei der olfaktorischen Konditionierung in der Honigbiene herbeiführen kann.⁷⁴ Weiter konnte gezeigt werden, dass elektrische Stimulation dieses Neurons oder eine Injektion des Neurotransmitters Octopamin ins Gehirn (Abbildung 1-10) entweder in die Loben der Antennen oder in die Kelche der Pilzkörper⁷⁵ ersatzweise für den US bei der olfaktorischen Konditionierung eingesetzt werden können. Somit hat das VUM_{mx1} ähnliche Eigenschaften wie dopaminerge Neuronen im Mittelhirn von Vertebraten.

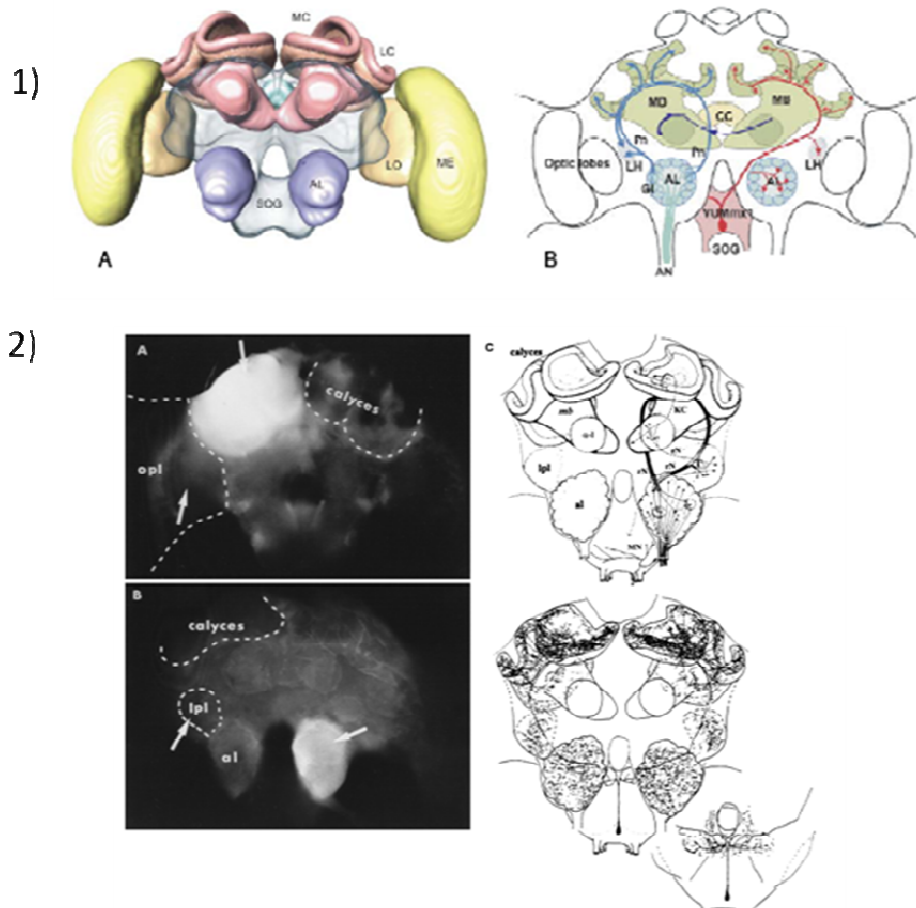


Abbildung 1-10: 1) Das Gehirn der Honigbiene: A) Frontaler 3 dimensionaler Überblick;⁷⁶ B) Zusammenfassende Ansicht des CS(blau)- und des US-Signalwegs (rot) bei der klassischen olfaktorischen Konditionierung.⁷⁷
 2) Darstellung des Gehirns der Honigbiene mit dem VUM_{mx1} -Neuron mit angezeichneten Loben der Antennen und Kelchen der Pilzkörper.⁷⁵

Bisher ist die konkrete Rolle des Octopamins in der klassischen Konditionierung noch unklar. Zahlreiche biochemische Studien zeigen, dass Octopamin an Membranproteine bindet, die zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören. Aktivierung dieser Rezeptoren durch Octopamin führt zu Konzentrationsänderungen der sekundären Botenstoffe cAMP, cGMP, Inositoltrisphosphat (IP_3) und Ca^{2+} .⁷⁸ Einer dieser Rezeptoren in der Biene (AmOA1) wurde 2003 kloniert und seine Funktion charakterisiert.⁷⁹

Um die Funktion des Octopamins in bestimmten Arealen des Bienenhirns im Detail zu untersuchen und seinen Einfluss auf das Lernverhalten bzw. die Gedächtnisausbildung besser zu verstehen, wird *caged* Octopamin als hilfreich erachtet. Bisher sind keine photoaktivierbaren, inaktivierten Octopamin-Verbindungen bekannt.

Dopamin

Dopamin (Struktur siehe Kapitel 2, Abbildung 2-1) ist ein biogenes Amin das zu den Glückshormonen gezählt wird.

Dopaminerge Neuronen von Säugetieren befinden sich vor allem im Mittelhirn, aber auch im Zwischen- und Endhirn, wo eine Vielzahl von lebenswichtigen Steuerungs- und

Regulierungsmechanismen vom Dopamin abhängen. Zusätzlich ist es ein wichtiger Neurotransmitter im vegetativen Nervensystem. Hier beeinflusst es die Regulierung der Durchblutung innerer Organe. In den dopaminergen Neuronen dient es der Reizübertragung über den synaptischen Spalt. Beim Menschen werden die Krankheit Morbus Parkinson und Psychosen mit Fehlfunktionen des dopaminergen Systems in Verbindung gebracht. Zudem wird Dopamin eine große Rolle bei Suchterkrankungen zugeschrieben. Dopamin wird in einigen Ländern als Medikament gegen das Restless-Legs-Syndrom eingesetzt.

Da bei der klassischen Konditionierung mit Belohnung gearbeitet wird und Dopamin ein wichtiger Neurotransmitter im ‚*Belohnungssystem*‘ ist, spielt Dopamin auch bei den Signalwegen des Lernens eine wichtige Rolle. Es gibt verschiedene Arbeiten, die diesen Einfluss auf das Lernverhalten dokumentieren.⁸⁰

LEE *et al.* beschrieben 1996 das erste und einzige *caged* Dopamin-Derivat.⁵⁸ Wie in Abbildung 1-11 gezeigt, handelt es sich dabei um **CNB-caged** Dopamin. Die photochemischen Eigenschaften wurden nicht beschrieben, sondern es wurde davon ausgegangen, dass es ähnliche Eigenschaften wie das **CNB-caged** Phenylephrin^{57b} aufweist. Hierfür wurde eine 1-Photonenquantenausbeute von 0,28 bei einer Photofreisetzung im 100-200 ms Zeitfenster gefunden.^{57b} Dopamin wurde durch Bestrahlung von **CNB-caged** Dopamin bei 254 nm freigesetzt und verschiedentlich zur Untersuchung dopaminergere Signalwege eingesetzt.^{58,81}

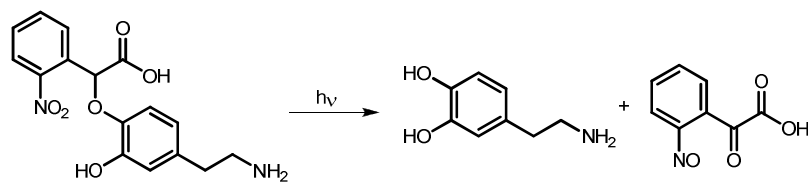


Abbildung 1-11: Photolyse von **CNB-caged** Dopamin.⁵⁸

Epinastin

Epinastin (Struktur siehe Kapitel 2, Abbildung 2-1) ist ein Antihistaminikum und wird zur Linderung der Beschwerden bei allergischen Bindehautentzündungen eingesetzt. Da es ein potenter H1-Antagonist ist, besetzt Epinastin die Histamin-Bindungsstellen am Rezeptor und verhindert somit die allergische Reaktion.

In Insekten besitzt Epinastin eine hohe Affinität für octopaminerge Rezeptoren in Neuronen. Gezeigt wurde dies bei den neuronalen Octopamin-Rezeptoren in Heuschrecken und im ZNS der Honigbiene.⁸² Da Epinastin in Insekten eine sehr geringe Affinität für die Rezeptoren der anderen biogenen Amine wie Dopamin, Histamin und Thyramin besitzt, gilt es als hoch spezifischer Antagonist für Octopamin-Rezeptoren⁸³ und ist hilfreich bei der Analyse der octopaminergen Signalwege in Invertebraten.

Caged Epinastin-Verbindungen waren bisher nicht bekannt.

1.5.2 Anisomycin und Emetin (Proteinsyntheseinhibitoren)

Innerhalb von Zellen werden Proteine durch Proteinsynthese (PS) gebildet. Die PS wird in die zwei Schritte Transkription und Translation geteilt. Die Transkription findet im Zellkern statt. Bei diesem Schritt der PS wird ein Gen aus der DNA abgelesen und in mRNA (*messenger ribonucleic acid*) transkribiert. Ist das Gen abgelesen, katalysiert die RNA-Polymerase die Synthese des komplementären RNA-Stranges aus Ribonukleosidtriphosphaten, ATP (Adenosintriphosphat), UTP (Uridintriphosphat), CTP (Cytidintriphosphat) und GTP (Guanosintriphosphat). Anschließend wird die gebildete mRNA ins Cytosol transportiert, wo die Translation stattfindet. Unter Translation versteht man die Übersetzung der Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz des Proteins. In der mRNA sind die Informationen über die Aminosäuren und ihre Reihenfolge in Codons gespeichert. Hier kommt nun die tRNA (*transfer ribonucleic acid*) ins Spiel. Sie hat zwei Bindungsstellen, eine für die jeweilige Aminosäure und eine für die mRNA, das Anticodon, mit der sie spezifisch an das Codon der mRNA bindet. Die Synthese der Peptide findet an dem Ribosom statt. Hier lagern sich die kleine und die große Untereinheit des Ribosoms an die mRNA und die tRNA an und die Peptidyltransferase verknüpft die an den tRNA angelagerten Aminosäuren mittels einer Peptidbindung.

Die PS ist sehr komplex und von vielen Faktoren abhängig. Das führt zur Suche nach Proteinsyntheseinhibitoren (PSIs), d.h. zu Molekülen, die an irgendeinem Punkt der Reaktionsabfolge eingreifen und eine Fertigstellung des Proteins bzw. Peptids verhindern. Bekannte PSIs sind u. a. die Biomoleküle Anisomycin und Emetin.

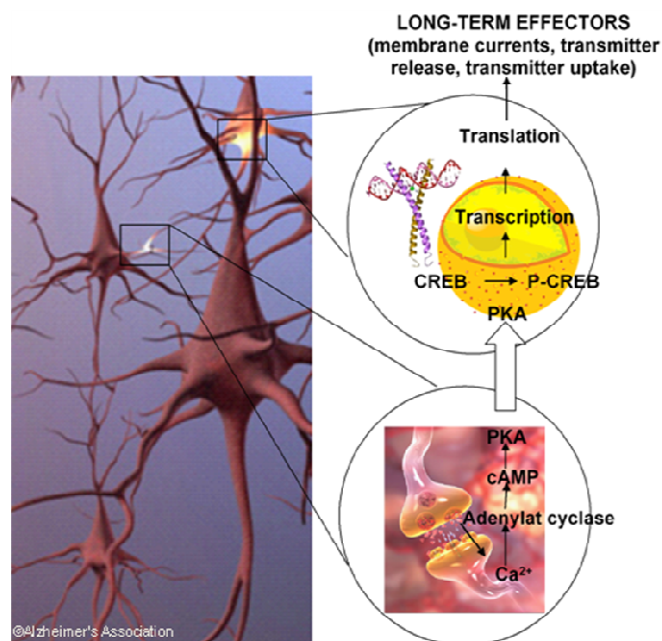


Abbildung 1-12: Darstellung der Kaskade zur Proteinsynthese in Neuronen der Honigbiene nach D. EISENHARDT *et al.* (PKA: Proteinkinase A, CREB: *cAMP responsive element binding protein*, P-CREB: phosphoryliertes CREB).⁸⁴

Die Gruppe um D. EISENHARDT untersucht die von der neuronalen Proteinsynthese abhängige Speicherung von Informationen im Gedächtnis der Honigbiene. Die in Kapitel 1.5.1 vorgestellte Thematik wird hier von einer anderen Seite näher betrachtet.

Untersucht wird die in Abbildung 1-12 dargestellte Signalkaskade, die zur Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses führt. Neuronale Aktivität löst an spezifischen Synapsen eine Neurotransmitterausschüttung aus, welche eine Kaskade von sekundären Botenstoffen an den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) aktiviert. Ein Beispiel dafür ist die cAMP-abhängige Signalkaskade. Hierbei führt die neuronale Aktivität zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, was wiederum zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. Nach der Translokation der PKA in den Zellkern löst diese die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP responsive element binding protein*) aus. Darauf folgt die Transkription von spezifischen CREB-regulierten Genen. Die so gebildete mRNA wird in spezifische Proteine translatiert, die für Langzeitveränderungen der synaptischen Plastizität und daraus folgende Gedächtniskonsolidierung verantwortlich gemacht werden.

Caged PSIs können gezielt zur zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Inhibierung der Translation eingesetzt werden, um besser zu verstehen, wann und wo Veränderungen der synaptischen Plastizität und der daraus folgenden Gedächtniskonsolidierung stattfinden.

2005 wurde bereits über den Einfluss von Glutamat auf die beschriebene Signalkaskade berichtet.⁸⁵ Durch den Einsatz von **CNB-caged**-L-Glutamat im ZNS der Honigbiene wurde gezeigt, welche Rolle Glutamat in diesem Zusammenhang spielt.⁸⁵

Anisomycin

Anisomycin (Struktur siehe Kapitel 2, Abbildung 2-1) wirkt als PSI über die Hemmung der Peptidbindungs-Bildungsreaktion in den eukariontischen Ribosomen, indem es reversibel an die 60S Untereinheit des Ribosoms bindet.⁸⁶

Es sind auch andere Eigenschaften des Anisomycins bekannt. GROLLMAN stellte 1967 eine Inhibierung der DNA-Synthese durch Anisomycin fest.^{86a} Daneben kann Anisomycin die stressaktivierten Proteinkinasen aktivieren und induziert die Aktivierung von unmittelbaren frühen Genen sowie den genetisch programmierten Zelltod.⁸⁷

Von GOARD *et al.* wurden 2005 verschiedene *caged* Anisomycin-Verbindungen eingeführt und zur Proteinsynthesehemmung in Zellen und Neuronen von Säugetieren eingesetzt.⁸⁸ Dabei handelt es sich um die in Abbildung 1-13 gezeigten Phototrigger **p-NBOC**-, **DMNBOC**- und **BHCMOC-caged** Anisomycin. **BHCMOC-caged** Anisomycin erwies sich in den Zelltests als die beste Verbindung. Bei diesem Derivat wurde die höchste Photoeffizienz erreicht und Anisomycin konnte auch durch 2-Photonen-Anregung mit einer Quantenausbeute von 0,59 GM freigesetzt werden.

2010 wurde das **DEACMOC**-Anisomycin (Abbildung 1-13) eingeführt.⁸⁹ Es wurde in einem *in vitro* Translationsassay erfolgreich eingesetzt.

Bis heute gibt es keine Arbeit, in der der Einsatz von einem *caged* Anisomycin-Derivat in Organismen beschrieben wird.

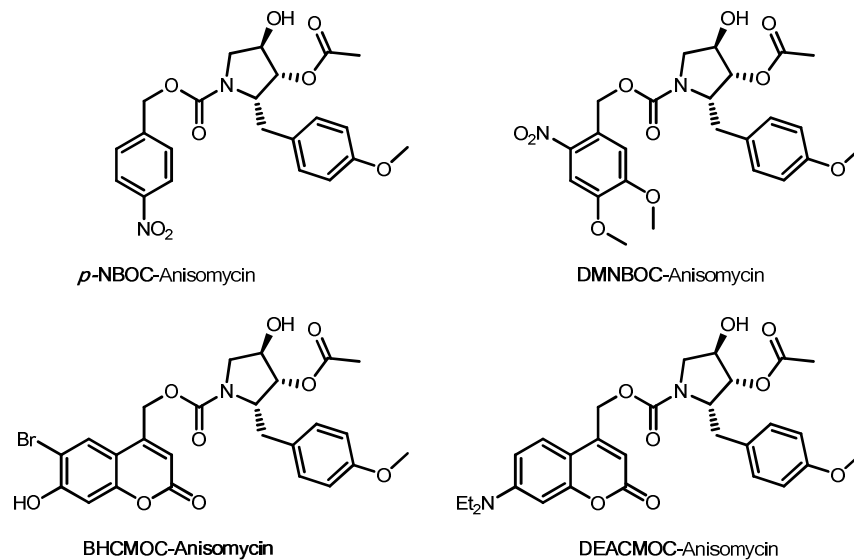


Abbildung 1-13: Bekannte *caged* Anisomycin-Verbindungen.⁸⁸⁻⁸⁹

Emetin

Beim Emetin (Struktur siehe Kapitel 2, Abbildung 2-1) handelt es sich um einen Naturstoff, der als PSI eingesetzt wird.⁹⁰ Es wurde aus der Brechwurzel isoliert und durch Naturstoffsynthese hergestellt.⁹¹ In der Medizin fand Emetin Anwendung als Brechmittel und als Antiprotozoikum, welches z.B. gegen Malaria und Toxoplasmose eingesetzt wurde. Heute wird Emetin nicht mehr als Medikament verwendet, da es andere Pharmaka mit einer effektiveren Wirkung und weniger Nebenwirkungen gibt.⁹²

Die Funktion von Emetin als PSI in eukaryontischen Zellen beruht auf einer nicht reversiblen Bindung an die 40S Untereinheit des Ribosoms, was wiederum die Elongationsreaktion der Polypeptidketten verhindert.⁹³ Partiiell kann Emetin auch die DNA-Synthese inhibieren.⁹⁰

Als PSI wurde Emetin in verschiedenen Untersuchungen zur Erforschung der zellulären Prozesse des Erinnerungsmechanismus speziell der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses angewendet.⁹⁴

Caged Emetin-Verbindungen sind bisher nicht beschrieben worden.

1.5.3 Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (Protonophor)

Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP) ist ein Ionophor, genau genommen ein Protonophor. Ionophore sind Moleküle, die Ionen (Protonen) durch die Membran transportieren bzw. die Permeabilität der Membran für Ionen erhöhen. Man unterscheidet Carrier-Ionophore und kanalbindende Ionophore. Bei den Carrier-Ionophoren handelt es sich um Moleküle, die Ionen binden, dann durch die Zellmembran diffundieren und dort die Ionen wieder freisetzen. Die kanalbindenden Ionophore sind kleine Proteine bzw. Peptide die Poren oder Transmembrankanäle bilden, durch die die entsprechenden Ionen diffundieren können. Protonophore sind wichtige Werkzeuge für Untersuchungen an Ionenkanälen.⁹⁵ Sie wurden auch im Arbeitskreis von T. JENTSCH (FMP und MDC Berlin) zur Erforschung der Struktur-Funktions-Beziehungen von Chloridionen-Kanälen in Lysosomen genutzt. Es ist bekannt, dass Ionenkanaldefekte Symptome bzw. Krankheiten wie Epilepsie, Hyperekplexie, Gehörlosigkeit, Blindheit, lysosomale Speicherkrankheiten, Lungeninfektionen, Unfruchtbarkeit bei Männern und Nierensteine verursachen.⁹⁶ Daher sind Erkenntnisse über die Funktion von Chlorid-Kanälen elementar wichtig, um Therapien gegen diese Krankheiten zu entwickeln.

Der Carrier-Protonophor CCCP (Abbildung 1-14) transportiert passiv Protonen durch die Ionenkanäle in der Lysosomenmembran lebenden Zellen. Die dadurch bedingte Depolarisation des Membranpotentials in den Lysosomen ist von dem pH-Wert außerhalb der Zelle abhängig. Je geringer der äußere pH-Wert ist, desto größer ist der von CCCP ausgelöste Depolarisationseffekt.⁹⁷

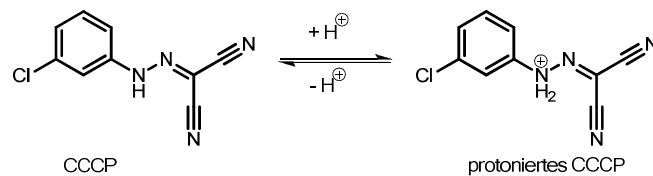


Abbildung 1-14: Neutrale und protonierte Struktur von CCCP.

Caged Protonophor-Verbindungen und somit natürlich auch *caged* CCCP-Derivate sind bisher nicht bekannt.

1.5.4 Bourgeonal (Riechstoff)

Der Riechstoff Bourgeonal, chemisch 3-(4-*tert*-Butylphenyl)propanal, wird in der Industrie als Duftstoff mit Maiglöckchenaroma verwendet.

Außerdem wird in verschiedenen Arbeiten, die sich mit den komplizierten Zusammenhängen bei der Suche der Säugetierspermien nach der Eizelle beschäftigen,⁹⁸ über die mögliche Wirkung von Bourgeonal⁹⁹ als Lockstoff diskutiert. Nachgewiesen wurde, dass menschliche Spermien mit Duftstoffrezeptoren für Bourgeonal ausgestattet sind^{99a} und es wurde gezeigt, dass menschliche Spermien ihre Schwimgeschwindigkeit und Bewegungsrichtung nach Bourgeonal ausrichten.^{99a} Bourgeonal-Rezeptoren kommen auch in Riechzellen vor. 2005 veröffentlichte R. AXEL eine Arbeit über die Genfamilie der Riechrezeptoren.¹⁰⁰ Er beschreibt den Signalweg des Geruchsrezeptors

(Odorant-Rezeptor, OR). Nach der Bindung des Riechstoffs an das OR-Protein aktiviert das olfaktorische G-Protein die Adenylatcyclase, welche ATP in cAMP umwandelt. Das gebildete cAMP stimuliert spezifische Ionenkanäle und somit den Ca^{2+} - und Na^{+} -Einstrom. SPEHR *et al.* stellten in ihren Untersuchungen die Bedeutung des testikulären OR-Gens (hOR17-4) für die Chemotaxis menschlicher Spermien heraus.^{99a,101} Bourgeonal soll ein sehr potenter Agonist für den hOR17-4-OR sein. Dennoch wird die Bedeutung von Bourgeonal als Lockstoff für menschliche Spermien kontrovers diskutiert und 2011 wiesen KAUPP *et al.* nach, dass Progesteron der entscheidende Lockstoff ist.¹⁰²

Im Prinzip sind viele Fragen über die Wirkung von Bourgeonal offen und *caged* Bourgeonal-Verbindungen könnten zur Aufklärung der ersten Schritte in den Signalwegen von Geruchsrezeptoren auch in menschlichen Spermien, welche im Millisekunden- bis Sekundenbereich stattfinden, eingesetzt werden.¹⁰³ Zu Beginn meiner Arbeit waren keine *caged* Bourgeonal-Verbindungen bekannt. Allerdings wurden in unserem Arbeitskreis parallel zu meiner Arbeit von F. KILIC (Cumarin-4-yl)methyl-substituierte 1,3-Dioxolane als *caged* Verbindungen von Bourgeonal entwickelt (siehe Abbildung 1-15).¹⁰⁴ Insbesondere **BBHC-ED-caged** Bourgeonal weist gute photochemische Eigenschaften auf.

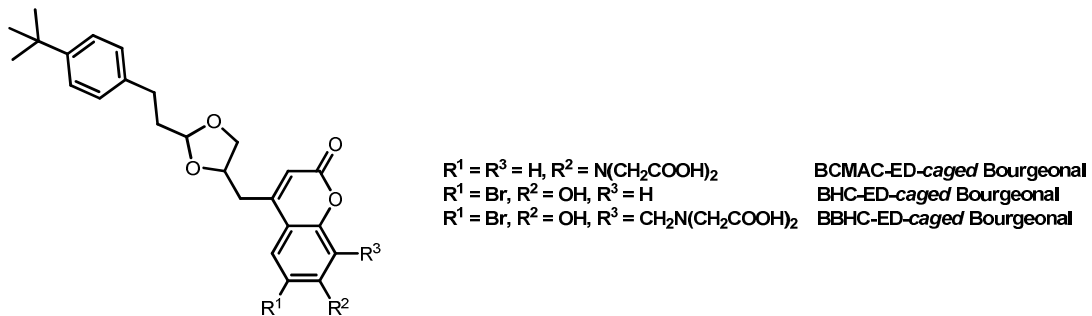


Abbildung 1-15: Strukturen von **CM-caged** Bourgeonal-Derivaten.

2 Aufgabenstellung

Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Entwicklung, Synthese und photochemische Charakterisierung von *caged* Verbindungen der Biomoleküle **1-7** (Abbildung 2-1). Die *caged* Biomoleküle sollten anschließend Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt werden, wo sie als Werkzeuge bei der Aufklärung von komplexen zellulären Prozessen dienen sollten. Im Falle der *caged* Verbindungen von Octopamin, Emetin, Anisomycin und Epinastin ergab sich zusätzlich die Notwendigkeit einer prinzipiellen zellbiologischen Eignungsprüfung der einzelnen Derivate.

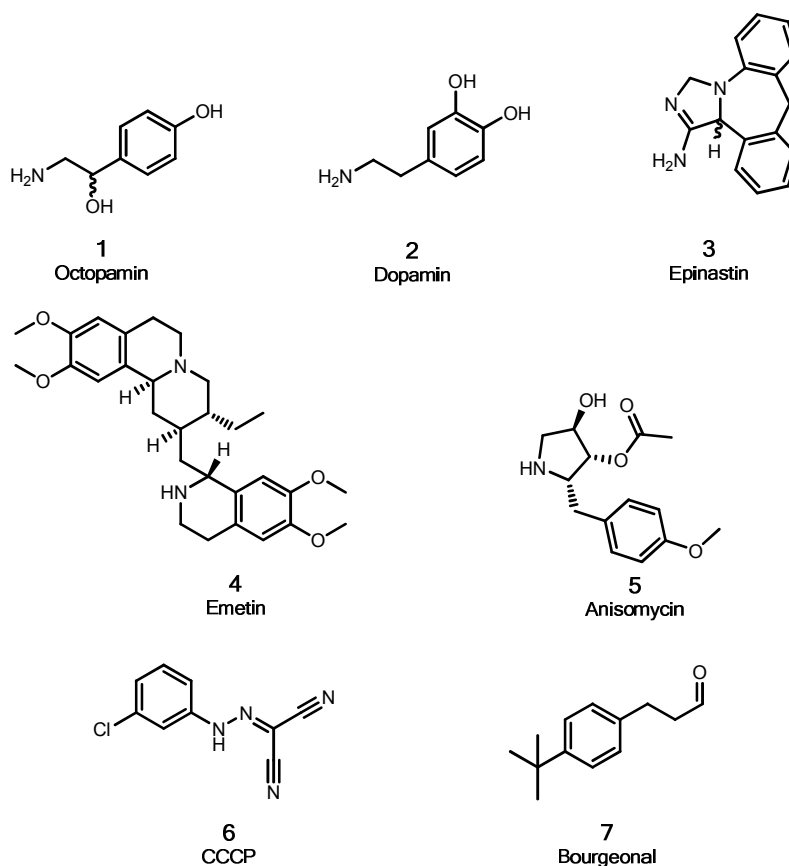


Abbildung 2-1 : Strukturen der bearbeiteten Biomoleküle.

Entscheidend für die Entwicklung von *caged* Biomolekülen mit möglichst optimalen Eigenschaften sind geeignete Chromophore bzw. PPGs. An die PPGs werden folgende Anforderungen gestellt: Die Photolysereaktion sollte effizient, schnell und ohne Nebenreaktionen erfolgen, der Chromophor sollte Licht langwellig und intensiv absorbieren und die *caged* Verbindungen sollten hydrolysestabil sein und eine gute Löslichkeit in wässrigen Puffern aufweisen. Die Arbeit umfasst zunächst das Design und die Herstellung entsprechender *Caging*-Reagenzien. Eigenschaftsoptimierungen sollten durch geeignete Substituenten an den Schutzgruppen-Chromophoren erreicht werden. Weiterhin mussten Synthesestrategien zu den verschiedenen Phototriggern erarbeitet werden und diese dann so optimiert werden, dass die gewünschten *caged* Verbindungen in ausreichenden Mengen synthetisiert werden konnten. Da die Biomoleküle, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit chemisch verändert

werden sollten, Carbonyl-, Amino- bzw. Hydroxy-Funktionen enthalten, mussten unterschiedliche Synthesevarianten bearbeitet werden.

Eine weitere wichtige Aufgabe bestand in der umfangreichen chemischen und photochemischen Charakterisierung der neuen *caged* Verbindungen. Neben der Strukturaufklärung sollten Löslichkeiten in Pufferlösungen (pH = 7,2), Absorptionsmaxima, sowie Extinktionskoeffizienten, photochemische Quantenausbeuten, Fluoreszenzquantenausbeuten sowie die Stabilität gegenüber Hydrolyse in physiologischen Medien ermittelt werden.

Sehr nützlich für den Einsatz der *caged* Verbindungen ist eine 2-Photonenanregbarkeit, da die gleichzeitige Absorption von 2 IR-Photonen eine höhere dreidimensionale Auflösung und eine wesentlich tiefere Gewebepenetration erlaubt. Deshalb sollte auch die Empfindlichkeit von Schlüsselverbindungen gegenüber einer 2-Photonen-Anregung untersucht werden. Zusätzlich sollten Informationen über die Freisetzungsgeschwindigkeit der Biomoleküle aus den *caged* Verbindungen gewonnen werden.

Die Biomoleküle **1-5** sollten mit verschiedenen (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl-PPGs geschützt werden, wobei zu Beginn die **BCMACMOC**- und **BHCMOC**-Chomophore favorisiert wurden. Von Octopamin sollten sowohl an der NH₂- als auch den beiden OH-Gruppen geschützte Derivate hergestellt werden. Ausgewählte *caged* Verbindungen des Neurotransmitters Octopamin und des Octopamin-Antagonisten Epinastin sollten in einem Zellsystem charakterisiert und dann in der Arbeitsgruppe von D. EISENHARDT (FU Berlin) als Werkzeuge für spezifische Untersuchungen im ZNS der Honigbiene eingesetzt werden. Speziell sollte versucht werden, den Einfluß octopaminerger Signalwege auf das Lernverhalten der Honigbiene aufzuschlüsseln.

Die *caged* Derivate des Anisomycins und Emetins mit den besten chemischen und photochemischen Eigenschaften waren in Kooperation mit B. WIESNER (FMP) und D. EISENHARDT in einem *in vitro translation assay* und später in GFP (*green fluorescent protein*) transfizierten Neuronen hinsichtlich einer möglichen biologischen Eigenaktivität zu untersuchen. Gleichzeitig sollten die Freisetzungsraten in Zellen bestimmt werden. Anschließend sollten die besten *caged* PSIs von D. EISENHARDT *et al.* zur detaillierten Erforschung des Einflusses der Proteinsynthese im ZNS der Honigbiene auf die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses genutzt werden.

Da für Ionophore bisher keine *caged* Derivate bekannt sind, war ein Syntheseweg zu erarbeiten, um den Protonophor CCCP (**6**) zu schützen. Das erhaltene CCCP-Derivat sollte vollständig chemisch und photochemisch charakterisiert werden und bei Eignung in der Arbeitsgruppe von T. JENTSCH (FMP) in Untersuchungen an Chloridionen-Kanälen eingesetzt werden.

Für den Riechstoff Bourgeonal (**7**) mit einer funktionellen Aldehydgruppe sollten im Rahmen eines Projekts verschiedene *caged* Verbindungen entwickelt werden. F. KILIC aus unserem Arbeitskreis sollte eine Serie von Cumarinylmethyl-*caged* Bourgeonal-Derivaten herstellen und ich mich auf die Synthese von 1,2-Bis(2-nitrophenyl)ethan-1,2-diolen und ihren Einsatz als *Caging*-Agenzien für Bourgeonal konzentrieren. Entsprechende Syntheseverfahren mussten erarbeitet und die erhaltenen *caged* Bourgeonale chemisch und photochemisch charakterisiert werden. Anschließend sollten ausgewählte Bourgeonal-Derivate im Arbeitskreis von U. B. KAUPP (caesar Bonn) für Untersuchungen

des Einflusses von Bourgeonal auf die Chemotaxis von Säugetierspermien sowie als Werkzeug für die Aufklärung von Mechanismen der Geruchswahrnehmung in Riechzellen eingesetzt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthesen

3.1.1 Vorbemerkungen

Die Biomoleküle Octopamin (**1**), Dopamin (**2**), Epinastin (**3**), Emetin (**4**) und Anisomycin (**5**) (Abbildung 2-1) wurden entsprechend der Zielstellung der vorliegenden Arbeit zunächst mit dem in unserem Arbeitskreis entwickelten {7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl (**BCMACMOC**)-^{33,35b} (Abbildung 1-1) und dem von FURUTA *et al.* eingeführten (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl(**BHCMOC**)-Chromophor³⁴ (Abbildung 1-1) an der Aminofunktion geschützt. Zur Synthese der Phototrigger wurde der entsprechende (Cumarin-4-yl)methylalkohol mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester in einen Aktivester überführt und dieser dann anschließend mit den Aminen unter basischen Bedingungen zur (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl-geschützten Verbindung umgesetzt. Durch den Einsatz von Di(*N*-succinimidyl)carbonat anstelle von Chlorameisensäure-4-nitrophenylester konnten die Ausbeuten erhöht werden.

Bei der Untersuchung der Eigenschaften der erhaltenen **BCMACMOC**-geschützten Verbindungen wurde eine relativ geringe photochemische Quantenausbeute Φ_{chem} festgestellt. Die untersuchten **BHCMOC**-geschützten Verbindungen wiesen deutlich höhere Φ_{chem} -werte auf, lösten sich aber im Gegensatz zu den **BCMACMOC**-caged Verbindungen schlecht in wässrigen Pufferlösungen. Deshalb wurde die {8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}methoxycarbonyl (**BBHCMOC**)-PPG^{36b} (Abbildung 3-10) neu entwickelt. Die mit diesem Chromophor maskierten Biomoleküle wiesen gute photochemische Eigenschaften sowie eine gute Wasserlöslichkeit auf und konnten erfolgreich in biologischen Untersuchungen eingesetzt werden. Um aber für spezielle Anwendungen die Membranpermeabilität von **BBHCMOC**-caged Verbindungen zu verbessern, wurden [6-Brom-8-(diethylaminomethyl)-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl (**DBHCMOC**)- und {6-Brom-7-hydroxy-8-[(piperazin-1-yl)methyl]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl (**PBHCMOC**)-Chromophore als neue PPGs für Aminoverbindungen eingeführt. Die bisher nicht beschriebenen *Caging*-Gruppen wurden erfolgreich zur Blockierung der Aminogruppe von Octopamin (**1**) eingesetzt. Die entsprechenden Phototrigger zeigten gute photochemische Eigenschaften und verbesserte Membranpermeabilitäten.

Da beim Octopamin (**1**) unklar war, welche funktionelle Gruppe in welchem Ausmaß seine biologische Aktivität bestimmt, wurden zusätzliche Synthesestrategien zum Maskieren der beiden verschiedenen Hydroxyfunktionen von **1** mit dem **BHCMOC**-Chromophor entwickelt.

Für die Maskierung der NH-Gruppe im CCCP (**6**) kamen 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)diazoethan^{24b} und 4-Diazomethyl-6,7-dimethoxycumarin zum Einsatz.

Der Aldehyd Bourgeonal (**7**) wurde mit dem von KANTEVARI eingeführten (1*S*,2*S*)-1,2-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1,2-diol (**BDMNP-ED**)^{18b} und dem im Rahmen dieser Arbeit neu

entwickelten sehr gut wasserlöslichen *Caging*-Reagenz (1*S*,2*S*)-1,2-Bis[4,5-bis(carboxymethoxy)-2-nitrophenyl]ethan-1,2-diol (**BBCMNP-ED**) umgesetzt und als 1,3-Dioxolan geschützt.

Wichtig für die Qualität von *caged* Verbindungen ist die Verfügbarkeit geeigneter *Caging*-Reagenzien. Deren Synthese wird nachfolgend zunächst beschrieben. **FPBHCM-OH** und **DBHCM-OH** mit ihren zugehörigen Aktivestern sowie **BBCMNP-ED** und **DMCM-N₂** sind im Rahmen dieser Arbeit entwickelte neue Agenzien zur Einführung von *Caging*-Gruppen. Neu entwickelt wurden auch **BBHCM-OH** und die entsprechenden Aktivester. Sie wurden allerdings in unserem Arbeitskreis parallel auch zum *Cagen* von Carbonsäuren und Thiolen eingesetzt.^{5c,36b,104}

3.1.2 Caging-Reagenzien

3.1.2.1 (Cumarin-4-yl)methyl-Verbindungen

tBCMAMC-OH (**12**)

Der **BCMAMC**-Chromophor als PPG für *caged* Verbindungen mit verschiedenen Funktionalitäten wurde 2005 von HAGEN *et al.* eingeführt.^{33,35b} **BCMAMC**-geschützte Verbindungen weisen sehr gute Löslichkeiten in wässrigen Puffersystemen (pH = 7,2), hohe Extinktionskoeffizienten im sichtbaren Bereich des UV-Lichts sowie eine ultraschnelle Photospaltung auf. Die Basis für die Einführung der **BCMAMC**-Schutzgruppe bildet das *Caging*-Reagenz 7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-(hydroxymethyl)cumarin (**12**).^{33,35b}

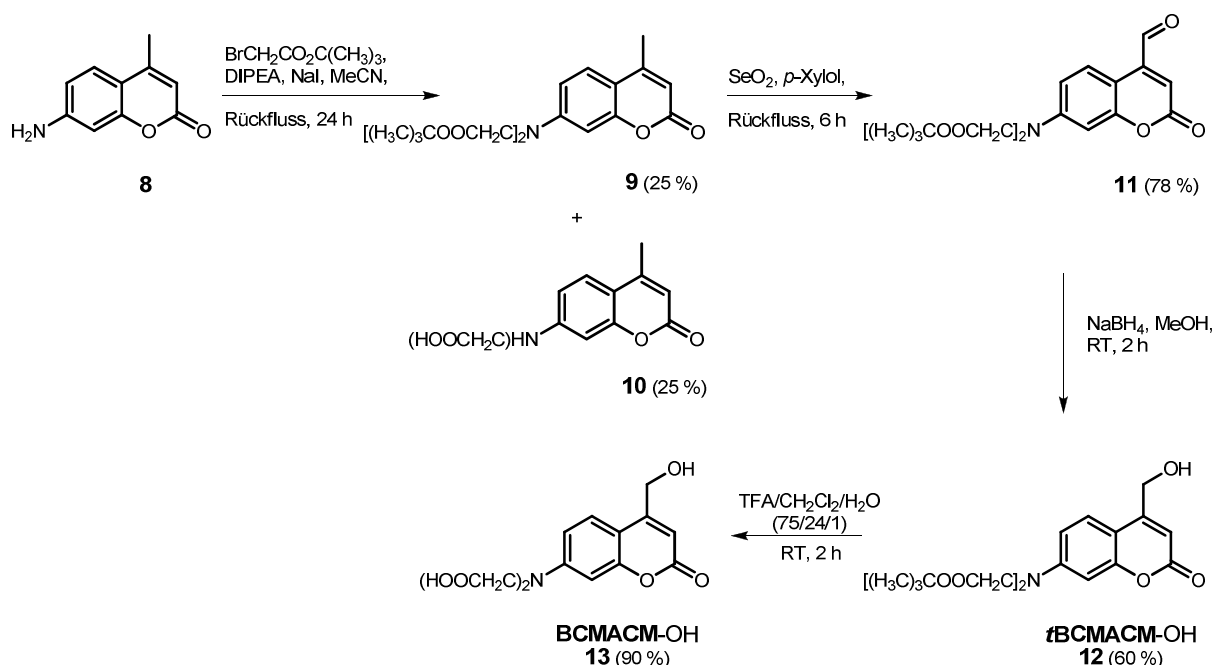


Abbildung 3-1: Synthese von 7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-(hydroxymethyl)cumarin (**12**).

Die in Abbildung 3-1 gezeigte Synthese von **12** geht von dem käuflichen 7-Amino-4-methylcumarin (**8**) aus.^{33,35b} Die Alkylierung von **8** mit Bromessigsäure-*tert*-butylester lieferte das 7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-methylcumarin (**9**). Bei dieser Bisalkylierung wurde nur eine Ausbeute von 25 % erreicht, da als Nebenprodukt auch das einfach alkylierte 7-(*tert*-Butoxycarbonylmethylamino)-4-methylcumarin (**10**) entstand. **10** konnte aber durch erneute Umsetzung mit Bromessigsäure-*tert*-butylester partiell weiter in **9** überführt werden. Die (Cumarin-4-yl)methyl-Verbindung **9** wurde weiter durch Riley-Oxidation mit SeO_2 zum Aldehyd **11** umgesetzt, welcher anschließend mit NaBH_4 zum (Cumarin-4-yl)methylalkohol **12** reduziert wurde. Das *Caging*-Reagenz **12** wurde letztlich bei der Maskierungsreaktion mit dem Biomolekül eingesetzt. Durch Abspaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppen in **12** mit TFA wurde 7-[Bis(carboxymethyl)amino]-4-(hydroxymethyl)cumarin

(**BCMACM-OH**, **13**) erhalten, welches auch bei der Photolyse aller **BCMACM-caged** Verbindungen gebildet wurde und damit als Referenzsubstanz zur Verfügung stand.

BHCM-OH (16)

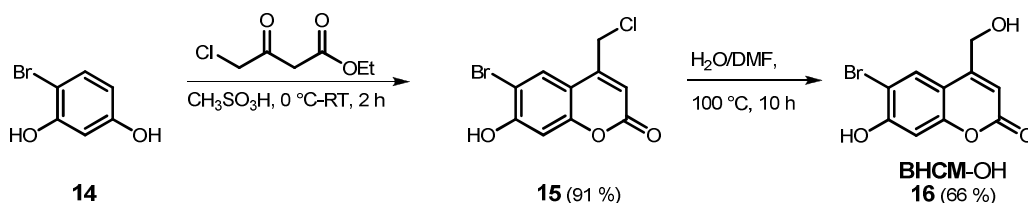


Abbildung 3-2 : Synthese von 6-Brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**16**).

Alternativ zur Verbindung **12** wurde das *Caging*-Reagenz 6-Brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**BHCM-OH**, **16**) nach einem von FURUTA *et al.* eingeführten Syntheseverfahren hergestellt (Abbildung 3-2).³⁴

Die Synthese von **16** geht von dem käuflichen Bromresorcinol (**14**) aus, das mit 4-Chloracetessigsäureethylester durch Pechmann-Reaktion zu 6-Brom-4-chlormethyl-7-hydroxycoumarin (**15**) umgewandelt wurde. Bei diesem Reaktionsschritt konnte durch Nutzung der von KILIC *et al.* gefundenen Optimierung der Reaktionsbedingungen¹⁰⁴ die Reaktionszeit von 6 d auf 2 h reduziert und die Ausbeute gleichzeitig von 59 % auf 91 % gesteigert werden. **15** wurde anschließend zu **BHCM-OH (16)** hydrolysiert, welches dann als Agenz für die Einführung der **BHCM**-Schutzgruppe eingesetzt wurde. Verbindung **16** entstand auch bei der Photolyse aller **BHCMOC**-Verbindungen. Weiterhin diente es als Ausgangsstoff für die nachfolgend aufgeführten *Caging*-Reagenzien **tBBHCM-OH (17)**, **FPBHCM-OH (18)** und **DBHCM-OH (19)**.

tBBHCM-OH (17)

Die **BHCM**- oder **BHCMOC**-Schutzgruppe für Biomoleküle weist gute photochemische Eigenschaften auf, ist aber selbst sehr hydrophob und führt bei gleichfalls hydrophoben Biomolekülen zu einer schlechten Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen. In unserer Arbeitsgruppe haben wir uns deshalb Gedanken gemacht, wie wir unter Beibehaltung des **BHCM**-Chromophors die Löslichkeit entsprechender *caged* Verbindungen erhöhen können. Im Ergebnis führte dies zu dem neuen *Caging*-Agenz 8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**tBBHCM-OH**, **17**)^{36b} und zu den **BBHCM**- und **BBHCMOC**-Schutzgruppen. Die Synthese von **17** wird in Abbildung 3-3 vorgestellt.

Die Einführung des hydrophilen Substituenten in die 8-Position des Cumaringerüsts gelang durch Mannich-Reaktion, wie bereits 1997 von ADAMCZYK *et al.* für 7-Hydroxy-cumarine publiziert.¹⁰⁵ Wie in Abbildung 3-3 aufgeführt, wurde der käufliche Iminodiessigsäure-di-*tert*-butylester **20** mit Formaldehyd zur Mannich-Base **21** umgesetzt, welche dann mit dem in der 8-Position C-H-aciden **BHCM-OH** zum Zwischenprodukt **22** reagierte. Nach Rearomatisierung des Ringes wurde **17** mit einer Ausbeute von 65 % erhalten. Die Abspaltung der *tert*-Butylgruppen lieferte den Alkohol **23**.

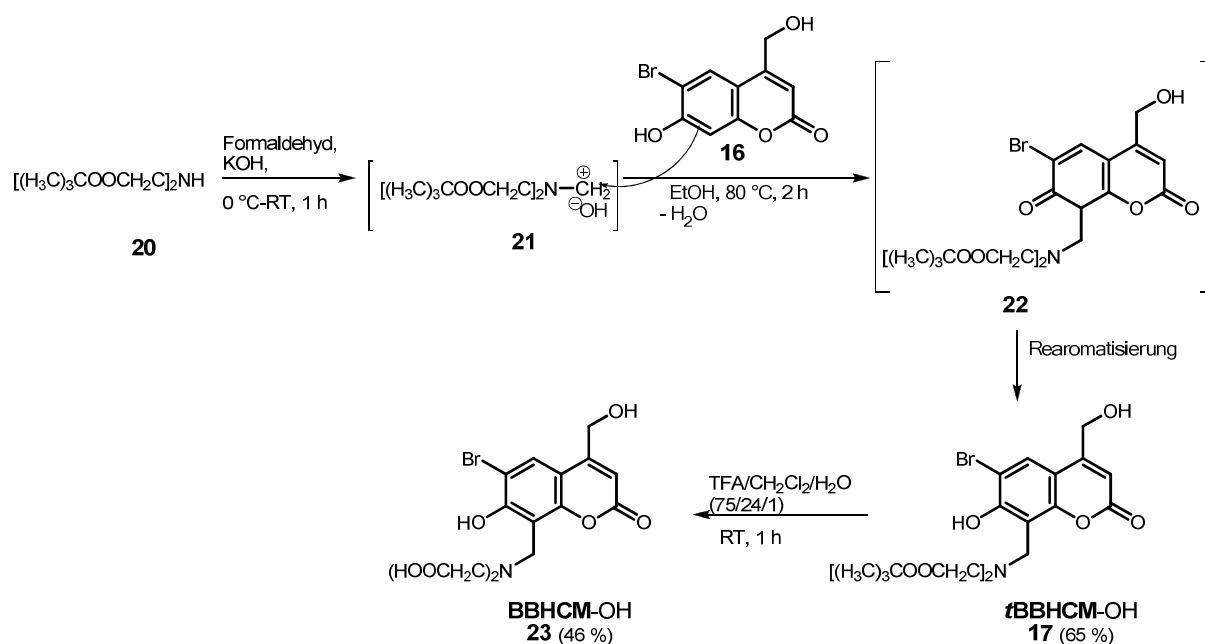


Abbildung 3-3: Darstellung von 8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**17**).

17 wurde nach Überführen in einen Aktivester hier erstmals zum Schützen von Biomolekülen mit Aminofunktion genutzt. **23** und die entsprechenden *caged* Verbindungen zeigten die erwarteten hohen Löslichkeiten.

FPBHCM-OH (**18**)

Um trotz hoher Löslichkeit in wässrigen Pufferlösungen eine ausreichende Zellmembranpermeabilität zu gewährleisten und damit das Anwendungspotential der 8-substituierten Cumarin-Chromophore zu erweitern, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere neue Schutzgruppe entwickelt. Das entsprechende Schutzgruppeneinführungsgenz ist 6-Brom-8-[[4-(fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]-piperazin-1-yl]methyl]-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**18**). Die Synthese von **18** wird in Abbildung 3-4 vorgestellt.

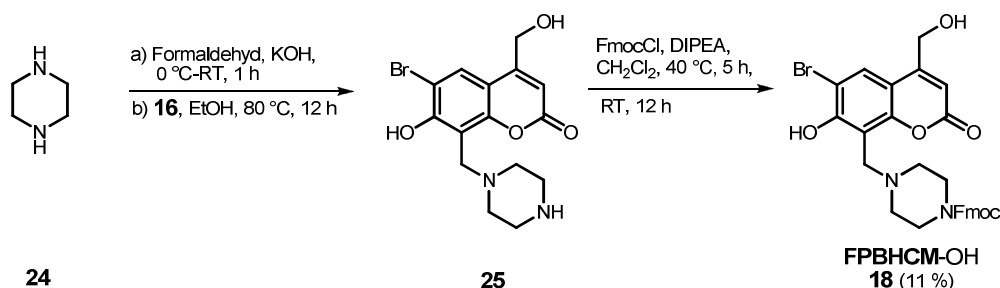


Abbildung 3-4 : Synthese von 6-Brom-8-[[4-(fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]piperazin-1-yl]methyl]-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**18**).

Die Einführung der Piperazinylmethyl-Gruppierung in die 8-Position des Cumarin-Gerüsts von **16** erfolgte gleichfalls durch Mannich-Reaktion. Die analoge Umsetzung ausgehend von 7-Hydroxycumarin war bereits dokumentiert.¹⁰⁶ Da für die Maskierung eines Biomoleküls an einer NH_2 -Gruppe die Aminofunktion des Piperazins geschützt sein muss, wurde zuerst wie in der Literatur

beschrieben, die Mannich-Reaktion von **16** mit Boc-Piperazin durchgeführt. Hierbei wurde mit einer Ausbeute von 89 % 6-Brom-8-[[4-(*tert*-butoxycarbonyl)piperazin-1-yl]methyl]-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**26**) gewonnen. Allerdings konnte bei der späteren Umsetzung der Verbindung zum Aktivester und dessen Weiterreaktion mit Octopamin nicht das gewünschte Produkt erhalten werden. Deshalb wurde die in Abbildung 3-4 gezeigte Reaktion ausgehend von CHO und **24** und die nachfolgende Umsetzung mit **16** zum 8-Piperazinylmethyl-substituierten Derivat **25** durchgeführt, welches ohne Isolierung mit FmocCl weiter zu **FPBHCM-OH (18)** umgesetzt wurde. Nach Reinigung mittels Flash-Säulenchromatographie konnte **18** mit 11 % Ausbeute isoliert werden. Mit Verbindung **18** gelang nach Umwandlung in einen Aktivester die Schützung von Octopamin.

DBHCM-OH (19)

Die Synthese vom 6-Brom-8-(diethylaminomethyl)-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**19**), einem weiteren neuen im Rahmen dieser Arbeit entwickelten potentiellen *Caging*-Agens, erfolgte analog der vorstehend beschriebenen Mannich-Reaktionen ausgehend von Diethylamin, CHO und der Cumarinverbindung **16** (siehe Abbildung 3-5). Der Vorteil von Verbindung **19** gegenüber dem Derivat **18** liegt in der höheren erzielbaren Ausbeute und der Vermeidung der Schutzgruppenabspaltung bei einer späteren *Caging*-Reaktion.

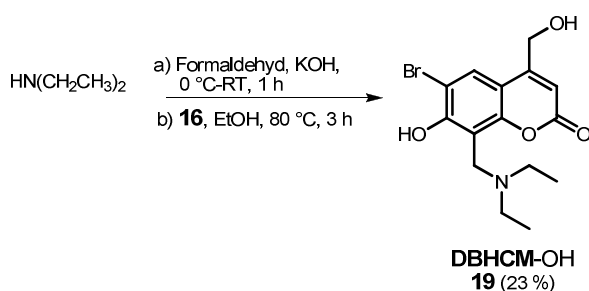


Abbildung 3-5: Synthese von 6-Brom-8-(diethylaminomethyl)-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin (**19**).

DMCM-N₂ (27)

Zur Einführung einer Cumarin-PPG am CCCP sollte eine 4-(Diazomethyl)cumarin-Verbindung hergestellt werden. Dafür wurde 4-Diazomethyl-6,7-dimethoxycumarin (**DMCM-N₂, 27**) ausgewählt und analog dem von ITO *et al.* publizierten Verfahren hergestellt (Abbildung 3-6).¹⁰⁷

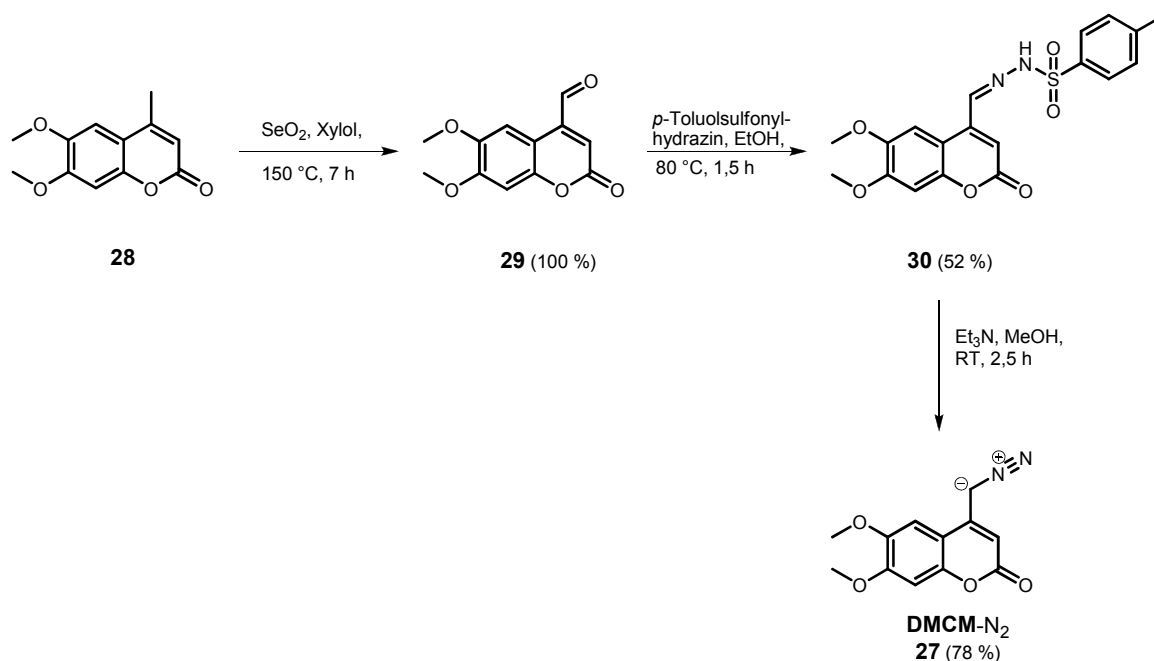


Abbildung 3-6: Synthese von 4-Diazomethyl-6,7-dimethoxycumarin (**27**).

6,7-Dimethoxy-4-methylcumarin (**28**) wurde mit SeO_2 oxidiert. Aus dem erhaltenen 6,7-dimethoxy-4-formylcumarin (**29**) wurde nach der Umsetzung mit *p*-Toluolsulfonylhydrazin das Tosylhydrazone **30** gewonnen. **30** reagierte anschließend in 2,5 h mit Et_3N in befriedigenden Ausbeuten zum **DMCM-N₂**.

3.1.2.2 Nitrobenzyl-Verbindungen

DMNPE-N₂ (**31**)

Die Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)diazoethan (**31**)^{24b} dem *Caging*-Agens zur Synthese von **DMNPE-caged CCCP** startete wie in Abbildung 3-7 gezeigt mit der Nitrierung des käuflichen 3,4-Dimethoxyacetophenons **32**. Unter den aufgeführten Nitrierungsbedingungen nach einer von Ni *et al.* publizierten Methode¹⁰⁸ wurde der 4,5-Dimethoxy-2-nitroveratrylaldehyd **33** in 86%ig. Ausbeute erhalten. Anschließend wurde **33** mit Hydrazin in Gegenwart von Eisessig in das Hydrazone **34** überführt. **34** wurde dann ohne weitere Aufarbeitung mit MnO_2 zur Diazoverbindung **31** umgesetzt, die, wie früher bei anderen Synthesen beschrieben,^{23a,24b,c,50a} sofort ohne Isolierung zum *Cagen* von CCCP eingesetzt wurde. Eine Ausbeute für die Bildung von **31** kann deshalb nicht angegeben werden.

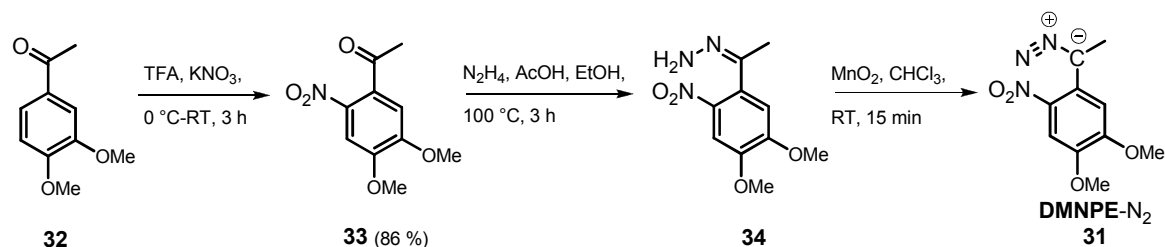


Abbildung 3-7 : Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)diazoethan (**31**).

BDMNP-ED (35)

Ein Verfahren zur Synthese von (1*S*,2*S*)-1,2-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1,2-diol (**BDMNP-ED**, **35**), welches durch Reaktion mit einem Aldehyd bzw. Keton in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure ein photolabiles cyclisches Acetal bildet, wurde 2005 von KANTEVARI entwickelt.^{18b} Er überführte 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylalkohol unter Einsatz von Phosphorylchlorid in 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylchlorid, welches innerhalb von 45 h unter dem Einfluß von KOH in DMSO/EtOH (1/3) zum Stilben weiterreagierte.

Der in Abbildung 3-8 gezeigte Syntheseweg zu **35** wurde alternativ zu dem von KANTEVARI vorgestellten Syntheschema erarbeitet, mit dem Ziel eine bessere Ausbeute zu erhalten. Lediglich bei der *cis*-Dihydroxylierung von **39a** und **39b** mit OsO₄ zu **35** wurde unter den von KANTEVARI publizierten Reaktionsbedingungen gearbeitet.

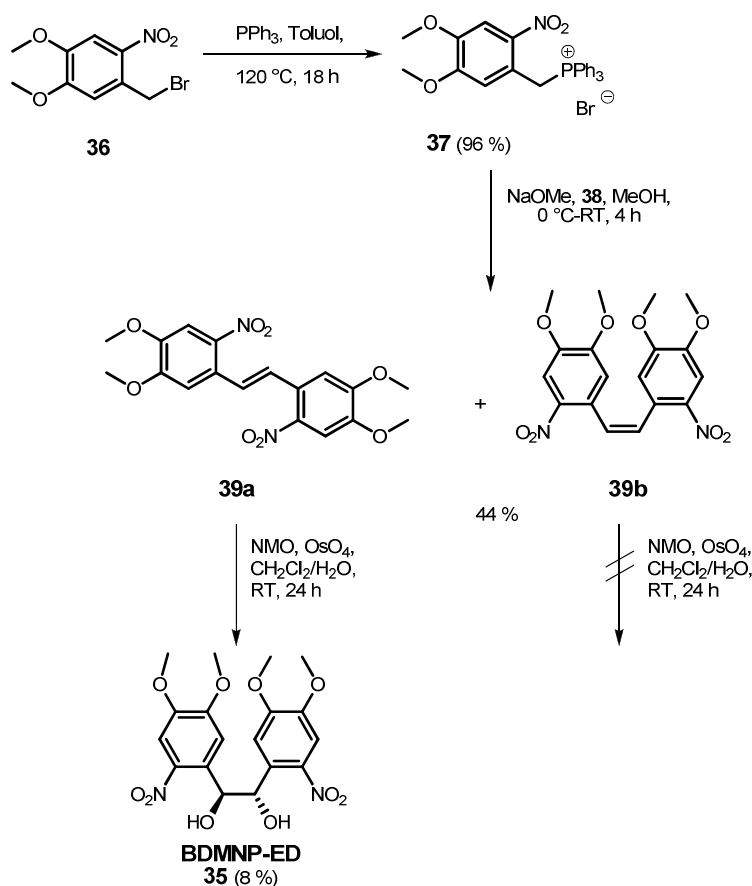


Abbildung 3-8: Synthese vom (1*S*,2*S*)-1,2-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1,2-diol (**35**).

Die Synthese geht von dem käuflich erhältlichen 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylbromid **36** aus. Seine Umsetzung mit PPh₃ nach CHANG *et al.* ergab mit 96%ig. Ausbeute das Triphenylphosphoniumbromid **37**.¹⁰⁹ In der anschließenden Wittig-Reaktion reagierte **37** mit 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzaldehyd (**38**) zu 1,2-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethen, welches in 44%ig. Ausbeute als Produktgemisch bestehend aus dem *trans*- (**39a**) und dem *cis*-Isomeren (**39b**) im Verhältnis 1 zu 4 erhalten wurde. Bei der folgenden *cis*-Dihydroxylierung des Stilbengemisches aus **39a** und **39b** mit OsO₄ und NMO setzte sich ausschließlich das *trans*-Isomer **39a** zum gewünschten **BDMNP-ED (35)** um, was zu der geringen Ausbeute von nur 8 % führte.

BBMCMNP-ED (40)

Ein wichtiger Anspruch an *caged* Verbindungen ist häufig eine ausreichende Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen, d.h. in wässrigen Medien bei pH = 7,2. Diese Anforderung erfüllt das oben beschriebene sehr hydrophobe **BDMNP-ED (35)** in der Regel nicht. Deshalb wurde die Entwicklung von (1*S*,2*S*)-1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethan-1,2-diol (**BBMCMNP-ED, 40**, Struktur siehe Abbildung 3-13) als neues *Caging*-Agens angestrebt. In Abbildung 3-9 werden die ersten Schritte bis zur Synthese von [4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl]triphenylphosphoniumbromid (**46**) gezeigt.

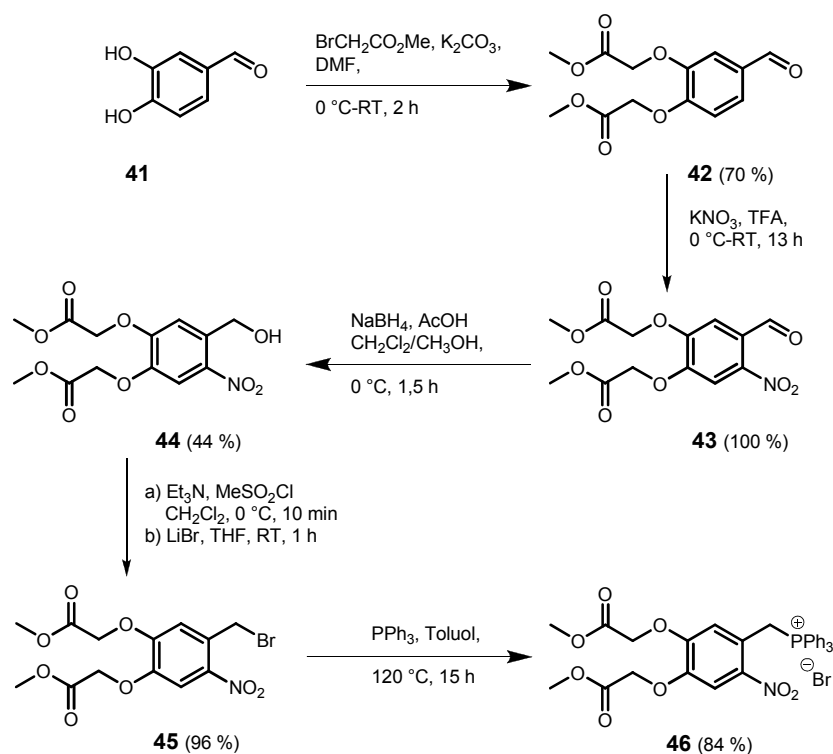


Abbildung 3-9: Synthese von [4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl]triphenylphosphoniumbromid (**46**).

Die Herstellung von 4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol (**44**) erfolgte nach einer bereits publizierten Methode.¹⁰⁸ Zunächst wurde 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**41**) mit Bromessigsäuremethylester an den beiden phenolischen Hydroxygruppen zum 3,4-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-Derivat **42** alkyliert. Bei der nachfolgenden selektiven Nitrierung von **42** in der *ortho*-Position wurde das Produkt **43** unter den schon bei der Synthese von **33** vorgestellten Bedingungen erhalten. Die Reduktion von **43** mit NaBH₄ ergab Verbindung **44**, welche durch Reaktion mit Methansulfonsäurechlorid und nachfolgende Behandlung mit LiBr in 4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylbromid (**45**) überführt wurde. Durch Umsetzung von **45** mit PPh₃ wurde [4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl]triphenylphosphoniumbromid (**46**) mit guten Ausbeuten erhalten.

46 reagierte mit 2-Nitrobenzaldehyd (**43**) in der in Abbildung 3-10 dargestellten Wittig-Reaktion¹¹⁰ mit einer Ausbeute von 85 % zu dem aus *trans*-1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethen (**47a**) und *cis*-1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethen (**47b**) bestehenden Stillbengemisch. Das bei der Reaktion erhaltene Produktgemisch konnte weder

säulenchromatographisch noch mittels präp. HPLC getrennt werden. Die analytische HPLC ergab ein Ausbeuteverhältnis von **47a** zu **47b** von 1:6.

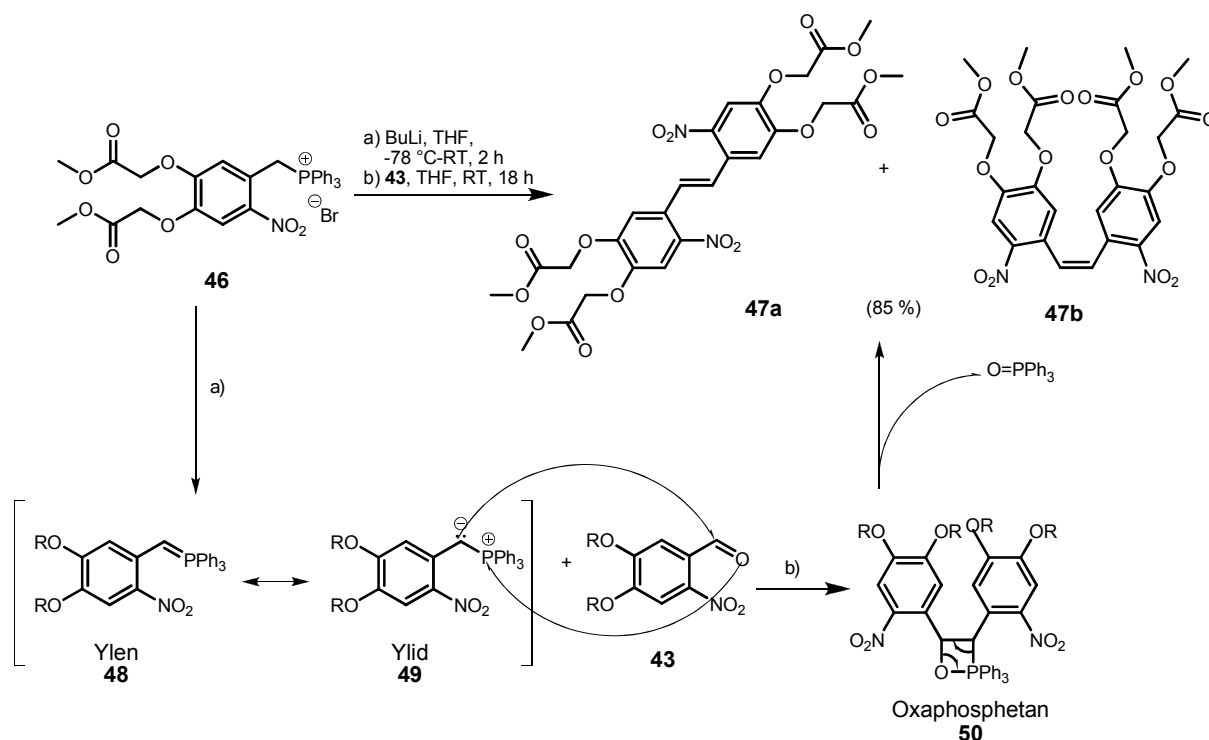


Abbildung 3-10: Wittig-Reaktion unter Bildung der 1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethen-Derivate **47a** und **47b**.

Da sich, wie bereits bei der Synthese von **BDMNP-ED (35)** beschrieben, auch in diesem Falle nur das *trans*-Isomer **47a** zum gewünschten **BBMCMNP-ED (40)** umsetzen ließ, wurde versucht Syntheseverarianten zu finden, die zu einer besseren *trans*-Selektivität führen. Bei der in Abbildung 3-10 gezeigten Wittig-Reaktion wird das Phosphoniumsalz **46** mit BuLi deprotoniert. Dabei entstehen die Mesomere **48** und **49**, welche als Ylen- und Ylid-Grenzstrukturen bezeichnet werden. Das freie Elektronenpaar des Ylids **49** greift nukleophil an dem partiell positiv geladenen Kohlenstoffatom der C=O-Gruppe des 2-Nitrobenzaldehyds **43** an, was zu der Ausbildung des Oxaphosphetans **50** führt. Die Triebkraft für die anschließende Eliminierung, die zu den Stilbenen **47a** bzw. **47b** und Triphenylphosphinoxid führt, ist die hohe Oxophilie des Phosphors.

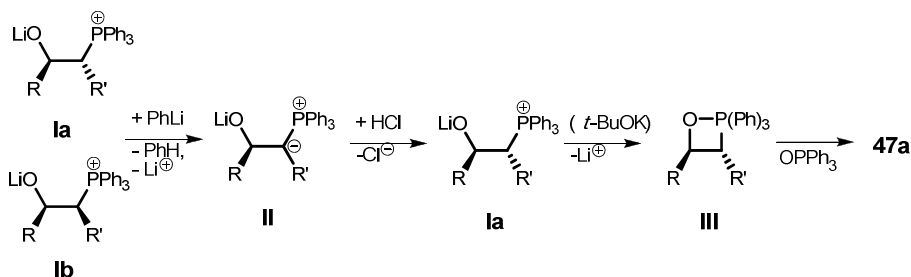


Abbildung 3-11: Reaktionsmechanismus für die Schlosser-Variante der Wittig-Reaktion.¹¹¹

Trans-konfigurierte Alkene sollen bei der in Abbildung 3-11 gezeigten Schlosser-Variante der Wittig-Reaktion mit höherer Stereoselektivität erhalten werden können.¹¹¹ Bei dieser Variante führt der Einsatz von Li-Halogeniden zu den intermediären Lithio-Betainen **Ia** und **Ib**. Durch Deprotonierung

dieser Zwischenstufen mit Phenyllithium bildet sich daraus die Ylid-Struktur **II**, deren Protonierung mit H^+ stereoselektiv zu **1a** führt. Durch Zugabe von *t*-BuOK wird in der Struktur **1a** Lithium durch Kalium ersetzt und es bildet sich anschließend das *trans*-Oxaphosphetan **III**. Aus diesem werden bei der normalen Wittig-Reaktion durch Eliminierung das *trans*-Olefin **47a** und Triphenylphosphinoxid erhalten.

Die Schlosser-Variante¹¹¹ der Wittig-Reaktion führte allerdings, ausgehend von Verbindung **46**, gleichfalls zu dem Stilbengemisch aus **47a** und **47b**. **47a** und **47b** wurden im Verhältnis 1:10 bei einer Gesamtausbeute von 31 % erhalten.

Es wurden auch verschiedene Isomerisierungsreaktionen von **47b** zu **47a** untersucht. So wurde versucht **47b** durch Erwärmen, durch Bestrahlung mit Licht und durch den Einsatz von $Pd(MeCN)_2Cl_2$ ¹¹² zu isomerisieren. Jedoch führte erst die Isomerisierung in Gegenwart von $HBr/AcOH$ ¹¹³ zur Umwandlung von **47b** in **47a**. Leider wurden unter diesen Reaktionsbedingungen auch die Methylestergruppierungen partiell gespalten, so dass mit 18 % nur eine unbefriedigende Ausbeute an **47a** erhalten werden konnte.

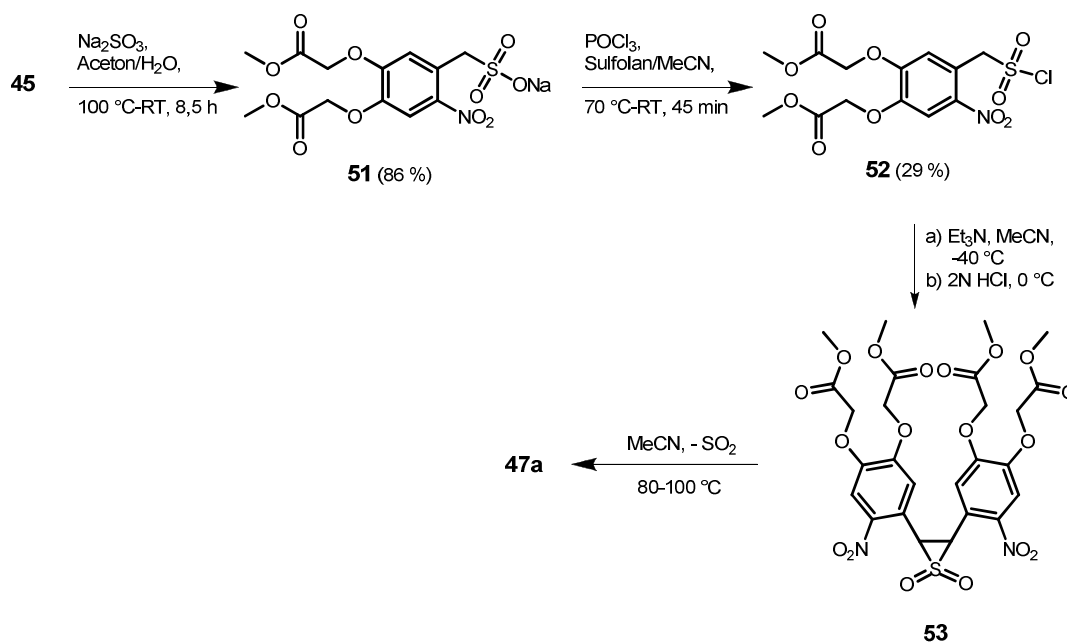


Abbildung 3-12: Syntheseversuch von **47a** nach WEDEKIND.¹¹⁴

Eine weitere Möglichkeit zur selektiven Synthese von *trans*-Alkenen ist 1911 von WEDEKIND vorgestellt worden.¹¹⁴ Es wurde versucht auch **47a** nach diesem Verfahren herzustellen. Nach der in Abbildung 3-12 aufgezeigten Syntheseverfahren wurde aus 2-Nitrobenzylbromid (**45**) zunächst das Natriumsulfonat **51** hergestellt, welches dann mit $POCl_3$ zum Sulfurylchlorid **52** umgesetzt wurde. Aus diesem sollte laut WEDEKIND unter Einsatz von Et_3N das Episulfon **53** gebildet werden, welches unter Temperaturerhöhung SO_2 abspalten und selektiv das *trans*-Stilben **47a** ergeben sollte.

Die Synthese von **52** verlief erfolgreich, jedoch konnte die Bildung von **53** nicht beobachtet werden. Es entstand zwar ein nicht identifiziertes neues Produkt, das aber weder zu **47a** noch zu **47b** umgesetzt werden konnte.

Schließlich wurde das bei der Wittig-Reaktion erhaltene Gemisch aus **47a** und **47b** mit OsO_4 zu **BBMCMNP-ED (40)** dihydroxyliert. Die Dihydroxylierung führte jedoch, da sich nur **47a** zu **40** umsetzte, zu der geringen Ausbeute von 5 % für **40**. Als günstig erwies sich aber, dass auf dieser Stufe das erhaltene Diol **40** vom Stilben **47b** mittels Flash-SC abgetrennt werden konnte. Die Hydroxylierung von reinem **47a**, das durch Isomerisierung erhalten worden war, mit OsO_4 ergab für **40** eine Ausbeute von 96 %.

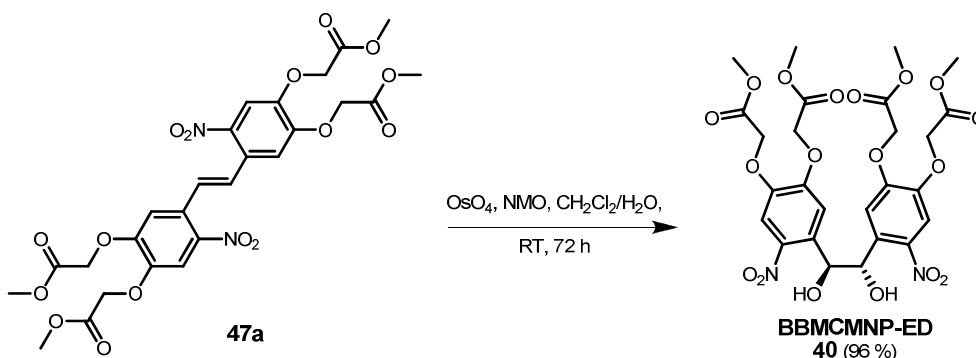


Abbildung 3-13: Darstellung von (1*S*,2*S*)-1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethan-1,2-diol (**BBMCMNP-ED**, **40**).

Aufgrund der geringen Ausbeuten bei den bisher aufgezeigten Synthesen zu den Diolen **35** und **40** wurde alternativ die Pinakol-Kupplung der Aldehyde **38** und **43** zu den entsprechenden Diolen versucht. Von CHATTERJEE *et al.* wurde 2008 die Pinakol-Kupplung zur stereoselektiven Synthese von 1,2-Diphenylethandiolen vorgestellt.¹¹⁵ Die Autoren fanden, dass sich der in Abbildung 3-14 dargestellte $\text{Ti}[(\text{Salen})\text{Cl}_2]$ -Komplex **54** am besten für diese Art der Pinakol-Kupplung eignet. Die Synthese von **54** (Abbildung 3-14 A)¹¹⁶ gelang glatt. Die Pinakol-Kupplung der Aldehyde **38** und **43** nach der in Abbildung 3-15 B aufgeführte Reaktion verlief jedoch nicht erfolgreich.

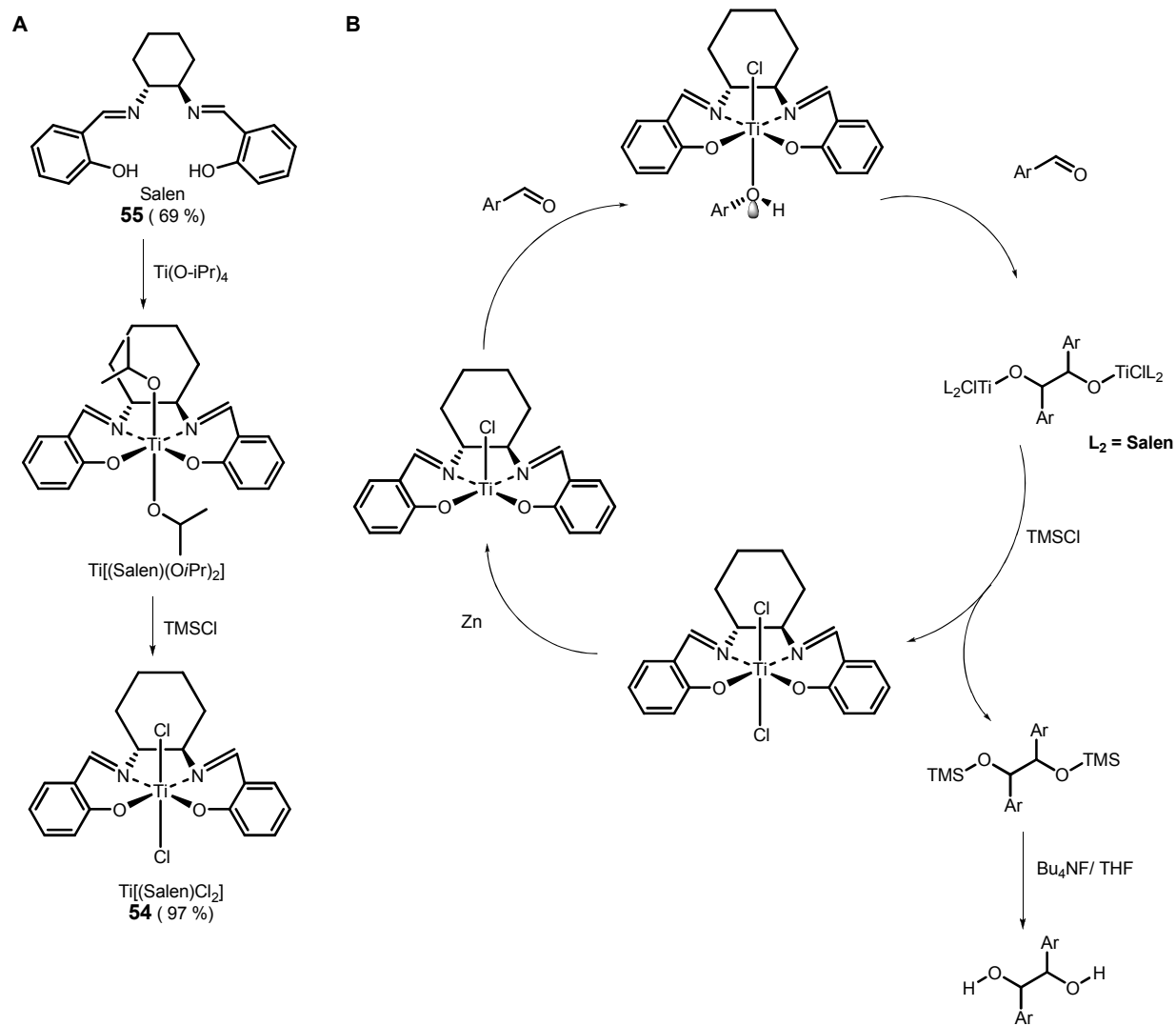


Abbildung 3-14: A) Synthese von $\text{Ti}[(\text{Salen})\text{Cl}_2]$; B) Pinakol-Kupplung von aromatischen Aldehyden mit dem $\text{Ti}[(\text{Salen})\text{Cl}_2]$ -Katalysator zu Alkandiolen.¹¹⁵

3.1.3 Synthese der *caged* Verbindungen

3.1.3.1 Aktivester

Die Biomoleküle **1-5** (siehe Abbildung 2-1) weisen eine Aminofunktion auf, welche mit den potentiellen (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppen **BCMAMC**, **BHCM** und **BBHCM** maskiert werden sollten. Amine, die direkt an (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppen gebunden sind, erwiesen sich jedoch als nicht photoaktivierbar. Deshalb mussten die Verbindungen **1-5** analog der Vorgaben von FURUTA *et al.* über eine Oxycarbonylbrücke an den Cumarin-Chromophor gebunden werden.³⁴ Zur Synthese derartiger Carbamat-Verbindungen wurden die **CM**-Alkohole **12**, **16** und **17** mit Chlorameisensäure-4-nitrophenylester in die Aktivester **56-58** überführt (Abbildung 3-15). Da bei der Reinigung der Aktivester mittels Flash-SC oder präp. HPLC ein Teil dieser Verbindungen hydrolysiert wurde, wurden sie ohne Reinigung als Rohprodukt weiter zur *caged* Verbindung umgesetzt. Lediglich das *O*-[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat **58** wurde zur Charakterisierung isoliert. Das gelang allerdings nur mit sehr geringen Ausbeuten. Die Verbindungen **56**^{23b,35b} und **57**³⁴ wurden bereits beschrieben.

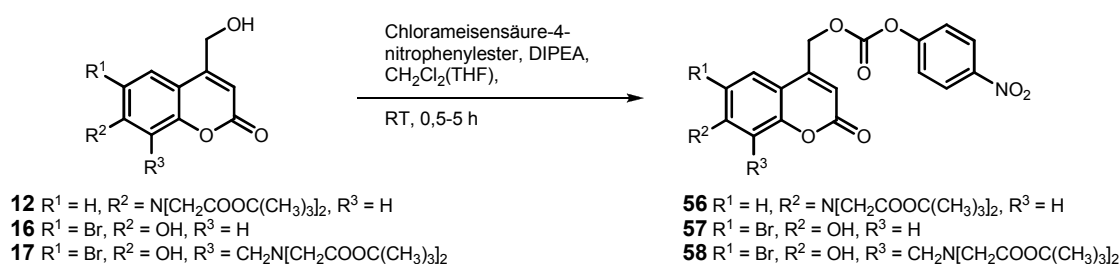
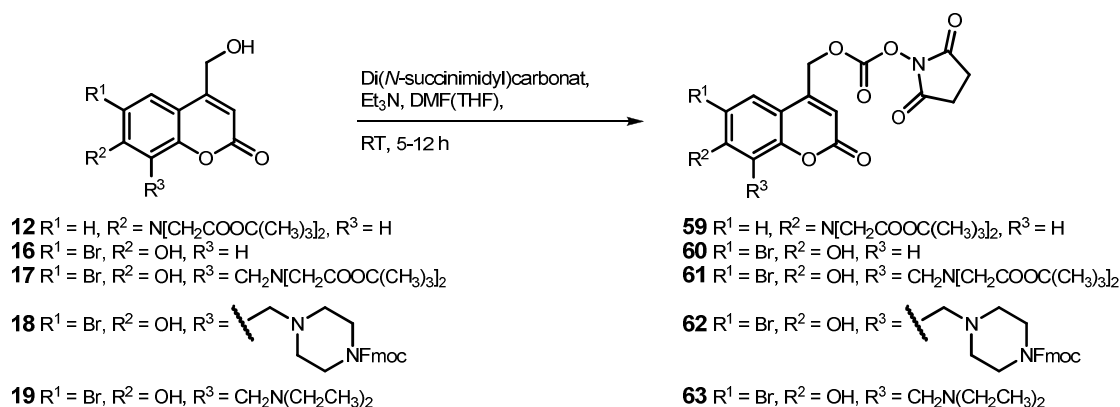


Abbildung 3-15: Synthese der *O*-(Cumarin-4-yl)methyl-*O*-4-nitrophenylcarbonate **56-58**.

Die Synthese der Carbamate aus den Aktivestern **56-58** funktionierte, brachte aber teilweise nur mäßige Ausbeuten. Alternativ wurden deshalb die in Abbildung 3-16 gezeigten Aktivester **59-61** aus den **CM**-Alkoholen **12**, **16** bzw. **17** und Di(*N*-succinimidyl)carbonat analog einem von D'ADDONA *et al.* vorgestellten Verfahren hergestellt.¹¹⁷ Die gebildeten Aktivester **60** und **61** wurden, da bislang nicht beschrieben, zur Charakterisierung isoliert, was auch hier nur mit geringen Ausbeuten gelang.

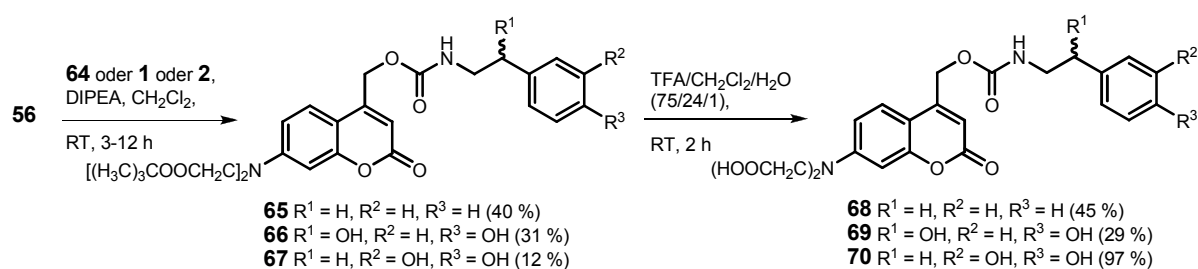
Da sich mit den Verbindungen **59-61** höhere Ausbeuten bei der Synthese der *caged* Verbindungen erzielen ließen, wurden auch die (Cumarin-4-yl)methylalkohole **18** und **19** mit Di(*N*-succinimidyl)carbonat zu den entsprechenden Aktivestern **62** bzw. **63** umgesetzt. Mit **62** und **63** konnte Octopamin erfolgreich in *caged* Verbindungen überführt werden.

Abbildung 3-16: Synthese der *O*-(Cumarin-4-yl)methyl-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonate **59-63**.

3.1.3.2 Caged Neurotransmitter

Octopamin (**1**) und Dopamin (**2**) sind dihydroxylierte Derivate von 2-Phenylethylamin (**64**). Aufgrund der einfacheren Struktur wurden deshalb zunächst an **64** verschiedene Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung mit den Aktivestern getestet. Die Reaktion des Aktivesters **56** mit **64** unter basischen Bedingungen ergab mit 40 % Ausbeute *N*-{[7-[Bis(*tert*-butoxy-carbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl]methoxycarbonyl}-2-phenylethylamin (**65**). Das Abspalten der *tert*-Butyl-Schutzgruppen am Substituenten des Cumarin-Gerüsts gelang unter Einsatz von TFA mit 45 % Ausbeute, d.h. die Gesamtausbeute betrug 18 %.

Die Herstellung von **BCMACMOC**-geschütztem Octopamin (**69**) gelang unter analogen Bedingungen aus **56** und **1** mit einer Gesamtausbeute von 9 %. Das **BCMACMOC**-geschützte Dopamin **70** konnte aus **56** und **2** mit 12 % Gesamtausbeute gewonnen werden.

Abbildung 3-17: Synthese von **BCMACMOC**-geschütztem Phenylethylamin (**68**), Octopamin (**69**) und Dopamin (**70**).

Bei der Synthese des Octopamin-Derivates **66** kam erstmalig auch der neu entwickelte Aktivester **59** zum Einsatz. Die in Abbildung 3-18 gezeigte Reaktion von **59** mit **1** ergab die Verbindung **66** mit 50 % Ausbeute, was im Vergleich zur Umsetzung von **56** und **1** eine Ausbeuteverbesserung um 61 % bedeutete.

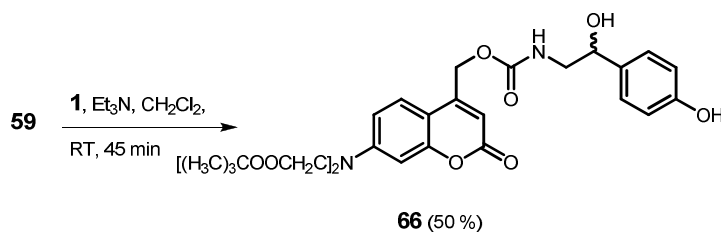


Abbildung 3-18: Synthese von *N*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-D,L-octopamin (**66**) aus **59**.

Die Synthese der in Abbildung 3-19 gezeigten **BHCMOC-caged** Verbindungen **71-73** erfolgte aus dem 4-Nitrophenylcarbonat **57** und den Biomolekülen **64**, **1** und **2**. Bei dieser in Analogie zur Herstellung der **BCMCMOC**-geschützten Verbindungen durchgeführten Reaktion wurden **BHCMOC-caged** Octopamin (**72**) und **BHCMOC-caged** Dopamin (**73**) in befriedigenden Ausbeuten gewonnen.

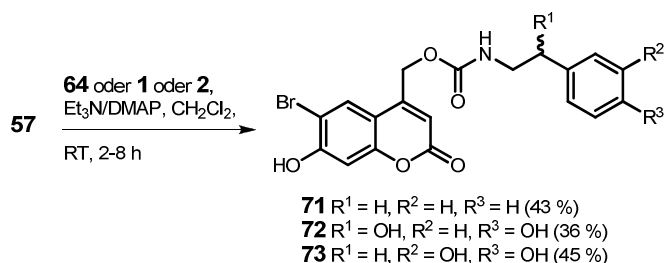
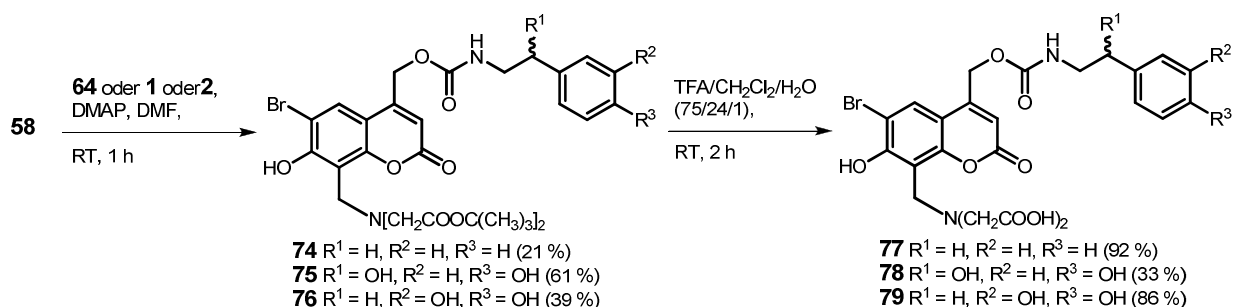


Abbildung 3-19: Synthese von **BHCMOC**-geschütztem Phenylethylamin (**71**), Octopamin (**72**) und Dopamin (**73**).

Die Einführung des neuen Chromophors **BBHCMOC** an die freie Aminogruppe der Verbindungen **64**, **1** und **2** (Abbildung 3-20) erfolgte durch Reaktion der Biomoleküle mit dem Aktivester **58** unter basischen Bedingungen. Dabei wurden die Verbindungen **74-76** erhalten. Nach der Abspaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppen am Substituenten in 8-Position konnten **BBHCMOC-caged** Phenylethylamin (**77**) mit einer Gesamtausbeute von 19 %, **BBHCMOC-caged** Octopamin (**78**) mit einer Gesamtausbeute von 20 % und **BBHCMOC-caged** Dopamin (**79**) mit einer Ausbeute über beide Stufen von 34 % erhalten werden.



Zum *Cagen* von Octopamin wurden auch die neu entwickelten Schutzgruppen **PBHC** und **DBHC** eingesetzt. Die in Abbildung 3-21 gezeigte Synthese von *N*-{{6-Brom-8-{{4-((fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)piperazin-1-yl)methyl}-7-hydroxycumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-D,L-octopamin

(**80**) konnte unter den aufgeführten Bedingungen allerdings nur mit 21%ig. Ausbeute erreicht werden. Bei der anschließenden Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin wurde das gewünschte *N*-{{6-Brom-7-hydroxy-8-[(piperazin-1-yl)methyl]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-D,L-octopamin (**PBHCmoc-caged Octopamin, 81**) mit fast quantitativer Ausbeute gewonnen.

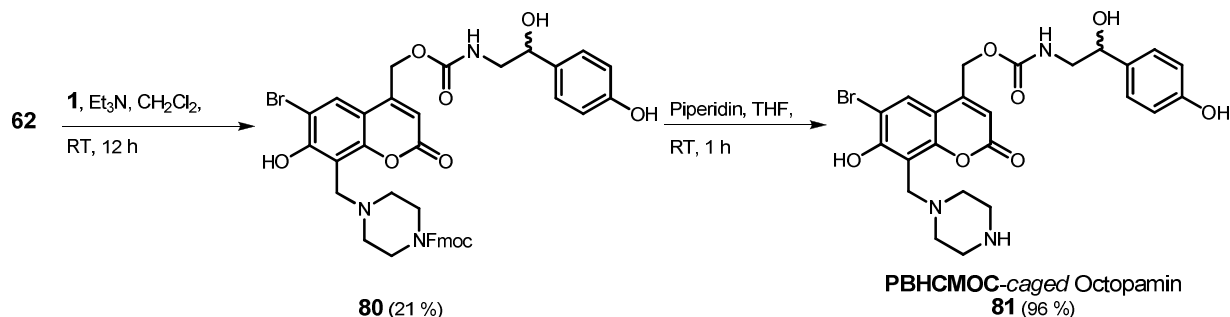


Abbildung 3-21: Synthese von **PBHCmoc-caged Octopamin (81)**.

Die Umsetzung von **DBHCM-OH (19)** zum Aktivester **63** mit der sofortigen Weiterreaktion des gebildeten **63** mit **1** ergab mit 31%ig. Ausbeute *N*-[[6-Brom-8-(diethylaminomethyl)-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl]-D,L-octopamin (**DBHCmoc-caged Octopamin, 82**).

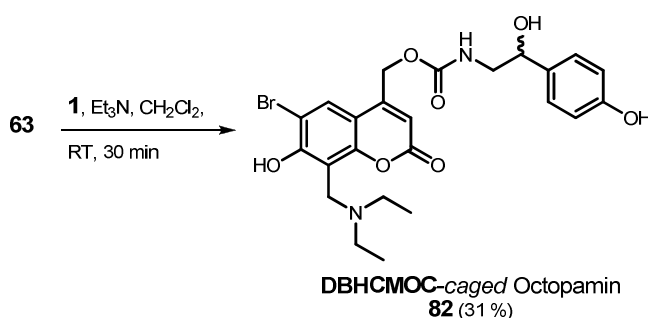


Abbildung 3-22: Synthese von **DBHCmoc-caged Octopamin (82)**.

Der Einsatz eines *caged* Octopamins in der Honigbiene dient der Erforschung der octopaminergen Signalwege. Da aber bisher nicht bekannt ist, welche funktionelle Gruppe im Octopamin entscheidend für seine Wirkung ist, wurde neben der Maskierung der Aminogruppe auch die Maskierung der phenolischen und der alkoholischen OH-Gruppe durchgeführt. In den Abbildungen 3-23 und 3-24 wird der Syntheseweg zum an der jeweiligen OH-Funktion geschützten *caged* Octopamin **89** bzw. **97** gezeigt. Da sich (Cumarin-4-yl)methylether nicht photochemisch spalten lassen und bei der Photolyse von (Cumarin-4-yl)methyl-geschützten Phenolen Umlagerungen beobachtet wurden, die nicht die Freisetzung der Phenole zur Folge hatten,¹¹⁸ wurden die OH-Gruppen im Octopamin mit dem Aktivester **60** in entsprechende photoaktivierbare Carbonate überführt.

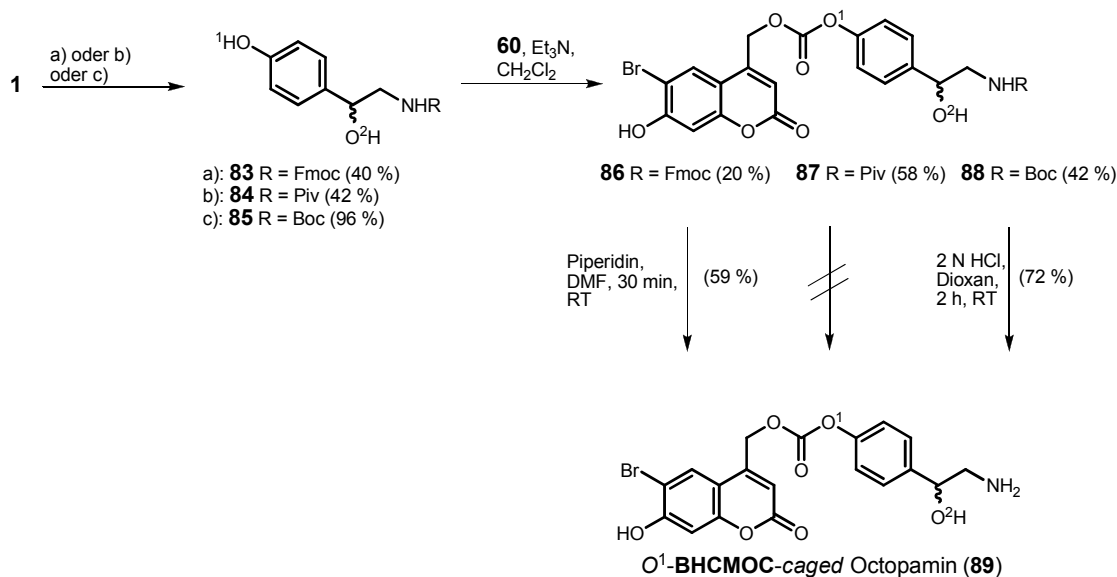


Abbildung 3-23: Synthese von *O*¹-**BHCMOC**-caged Octopamin (**89**). a) DIPEA, FmocCl, CH₂Cl₂, 1 h, RT; b) CsCO₃, Pivaloinsäureanhydrid, 0 °C-RT; c) Et₃N, Di(*tert*-butyl)dicarbonat, EtOH, 24 h, RT.

Zur Synthese des an der phenolischen OH-Gruppe geschützten D,L-Octopamins [*O*¹-**BHCMOC**-caged Octopamin, **89**] musste Octopamin zunächst an der Aminofunktion geschützt werden. Deshalb wurde **1** mit FmocCl zum *N*-[(Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]-D,L-octopamin (**83**) umgesetzt. Bei der anschließenden Reaktion von **83** mit dem Aktivester **60** in Gegenwart von Et₃N wurde das Carbonat **86** gebildet. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe an der Aminofunktion wurde das gewünschte *O*¹-**BHCMOC**-caged Octopamin mit einer Gesamtausbeute von 5 % erhalten.

Die Vermutung, dass sterische Gründe bedingt durch die Größe der Fmoc-Schutzgruppe für die geringe Gesamtausbeute bei der Herstellung von **89** verantwortlich sind, war der Anlass dafür, die Pivaloyl-Schutzgruppe zum Blockieren der Aminofunktion einzusetzen. Nach Literaturangaben wurde die Pivaloyl-PG zum Maskieren einer Aminofunktion neben einer freien Hydroxyfunktion eingesetzt und konnte auch ohne Probleme wieder abgespalten werden.¹¹⁹ Die Maskierung der Aminofunktion von **1** als *N*-Pivaloyl-D,L-octopamin (**84**) gelang problemlos und bei der anschließenden Reaktion mit **60** wurde eine deutlich höhere Ausbeute an *O*¹-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-*N*-pivaloyl-D,L-octopamin (**87**) erzielt. Das entstandene Carbonat **87** war jedoch säurelabil, so dass bei Versuchen die Pivaloyl-Gruppe abzuspalten immer erst die Carbonatstruktur gespalten wurde.

Schließlich kam es zum Einsatz der Boc-Schutzgruppe (siehe Abbildung 3-23). Dabei konnte *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-D,L-octopamin (**85**) aus **1** und Di(*tert*-butyl)dicarbonat hergestellt werden. Das bei der anschließenden Reaktion mit **60** erhaltene *O*¹-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-D,L-octopamin **88** konnte mit HCl in Dioxan zu *O*¹-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-D,L-octopamin [*O*¹-**BHCMOC**-caged Octopamin, **89**] umgesetzt werden. Über die drei Synthesestufen wurde eine Ausbeute für **89** von 30 % erreicht.

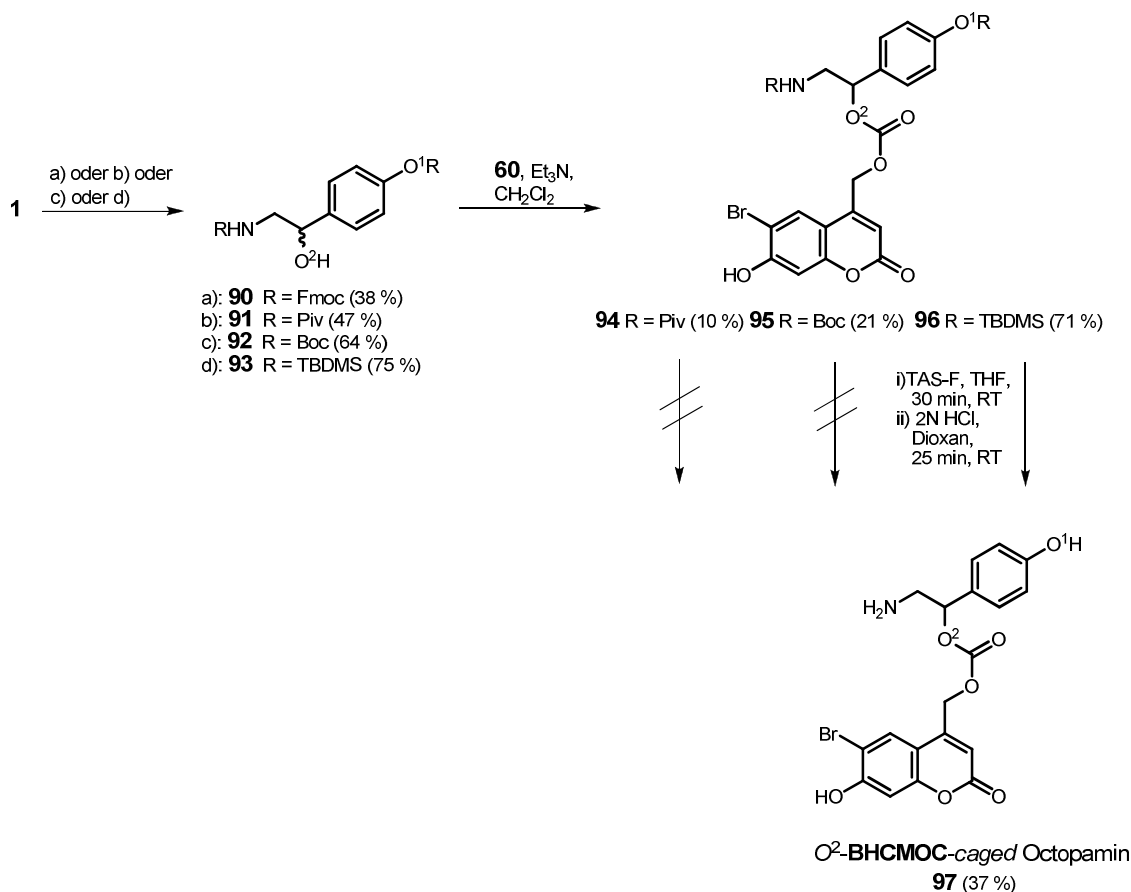


Abbildung 3-24: Synthese von O^2 -BHCMOC-caged Octopamin (**97**). a) DIPEA, FmocCl, CH_2Cl_2 , 1 h, RT, b) Cs_2CO_3 , Pivaloinsäureanhydrid, 0 °C-RT, c) Et_3N , Di(*tert*-butyl)dicarbonat, EtOH, 36 h, 40 °C, d) Et_3N , *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMSCl), MeCN, 70 h, RT.

Die ersten Versuche zur Synthese von O^2 -[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-D,L-octopamin [O^2 -BHCMOC-caged Octopamin, **97**] wurden, wie in Abbildung 3-24 aufgeführt, mit dem Schützen der NH_2 - und der phenolischen OH-Funktion mit der Fmoc-, Pivaloyl- bzw. Boc-Schutzgruppe gestartet. Bei der Behandlung von der Fmoc-geschützten Verbindung **90** mit dem Aktivester **60** konnte jedoch keine Reaktion beobachtet werden. Bei der Umsetzung von den Pivaloyl- bzw. Boc-geschützten Verbindungen **91** bzw. **92** mit **60** fand die Reaktion zum O^2 -[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-*N,O^1*-bis(pivaloyl)-D,L-octopamin (**94**) bzw. O^2 -[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-*N,O^1*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-D,L-octopamin (**95**) in guten Ausbeuten statt. Allerdings konnte keine Entschützungsvariante für **94** bzw. **95** gefunden werden, bei der das gebildete Carbonat stabil blieb.

Auf der Suche nach einer sinnvollen Schutzgruppenstrategie half eine Konformationsanalyse die in Zusammenarbeit mit A. KEUCHWICK (FMP Berlin) durchgeführt wurde. Ziel dieser Kooperation war es, die Gründe dafür zu ermitteln, warum Verbindung **92** mit dem Aktivester **60** reagierte, nicht aber Verbindung **90**.

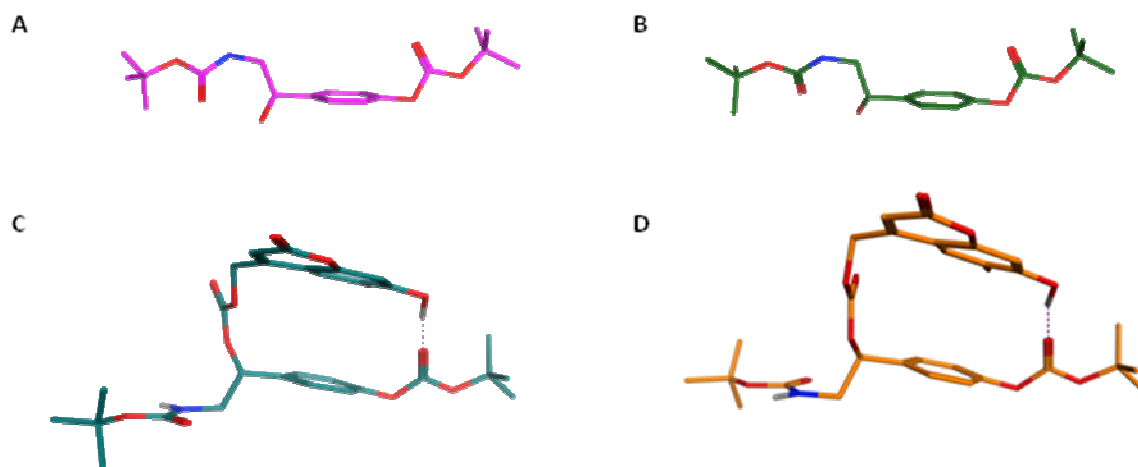


Abbildung 3-25: Energieärmste Konformationen der Octopamin-Derivate **92** und **95**. A) *R*-Form von **92**; B) *S*-Form von **92**; C) *R*-Form von **95**; D) *R*-Form von **95**.

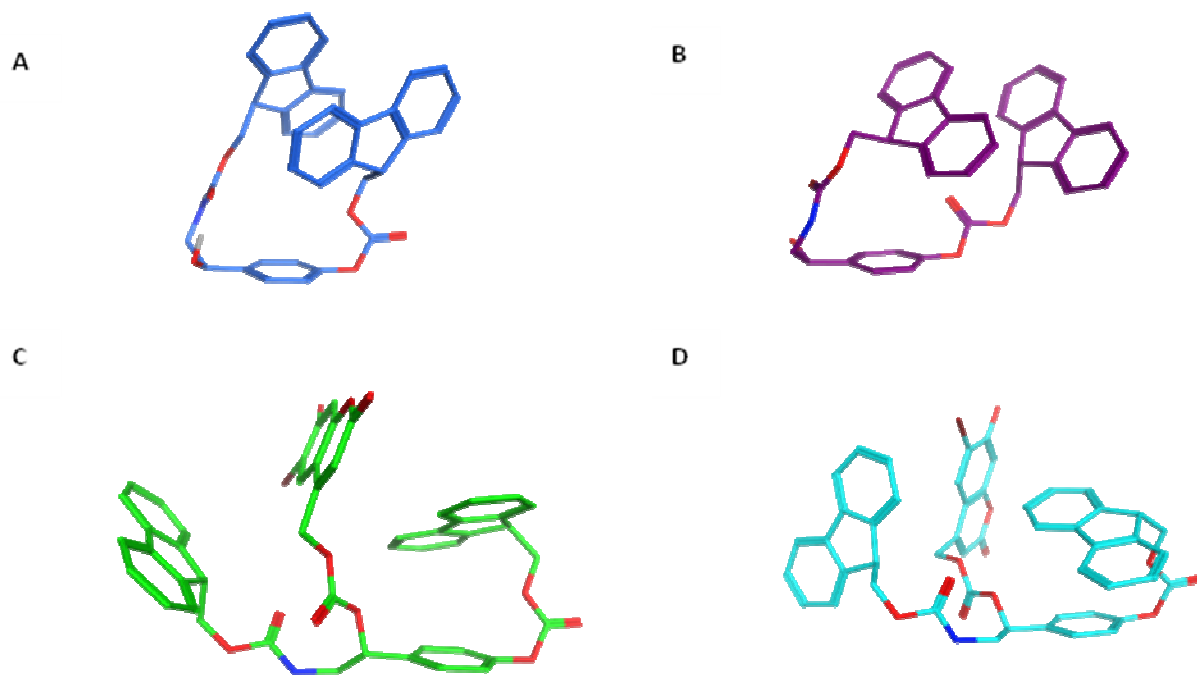


Abbildung 3-26: Energieärmste Konformationen des Octopamin-Derivates **90** und des virtuellen Reaktionsproduktes aus **90** und **60**. A) *R*-Form von **90**; B) *S*-Form von **90**; C) *R*-Form des virtuellen Reaktionsproduktes aus **90** und **60**; D) *R*-Form des virtuellen Reaktionsproduktes aus **90** und **60**.

A. KEUCHWICK berechnete die wahrscheinlichsten Konformationen (Methode: Stochastic Search in MOE 2010.10), das heißt die energieärmsten Konformationen der Verbindungen **92** und **95** (Abbildung 3-25). Da Octopamin als Racemat vorliegt, wurden die energieärmsten Konformationen sowohl für die *R*-Konfiguration als auch für die *S*-Konfiguration ermittelt. Wie erwartet, konnten keine

sterischen Gründe festgestellt werden, welche die Reaktion behindern würden. Für **95** wurden Konformationen erhalten, die durch ein versetztes (gestaffeltes) System der aromatischen Ringe und eine Wasserstoff-Brückenbindung stabilisiert sind.

Die berechneten energieärmsten Konformationen der *R*- und *S*-Form von **90** und des virtuellen Reaktionsproduktes aus **90** und **60** zeigten dagegen (vgl. Abbildung 3-26) eine starke sterische Abschirmung der aliphatischen OH-Gruppe im Octopamin. Bei Verbindung **90** müssten drastische Veränderungen in der Konformation eintreten, damit eine mögliche Reaktion an der aliphatischen OH-Gruppe stattfinden kann.

Folglich müßte eine Schutzgruppe für die NH₂- und die phenolische OH-Gruppe gefunden werden, die weder mit Säuren oder starken Basen abgespalten werden muss, und so klein ist, dass das doppelt geschützte Octopamin weiterreagieren kann. Eine solche Schutzgruppe wurde in der *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe gefunden. Die Synthese von 1-Hydroxy-1-[4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl]-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)ethylamin (**93**) und auch die Reaktion von **93** mit **60** zum *O*²-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-*N,O*¹-bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*D,L*-octopamin **96** ergaben gute Ausbeuten (Abbildung 3-24). Bei der Abspaltung der Silylschutzgruppen musste in zwei Schritten vorgegangen werden. Die Silylschutzgruppe an der phenolischen OH-Gruppe konnte nur unter Einsatz von Tris(dimethylamino)sulfon-trimethylsilyldifluorid (TAS-F) abgespalten werden ohne gleichzeitig das Carbonat zu spalten. Allerdings konnte mit diesem Reagenz die Silylschutzgruppe an der Aminofunktion nicht abgespalten werden. Dies gelang aber mit 2N HCl in Dioxan. Beide Abspaltungen wurden ohne Aufarbeitung nacheinander durchgeführt. *O*²-**BHCMOC-caged** Octopamin (**97**) konnte über alle Syntheseschritte ausgehend von Octopamin mit einer Ausbeute von 20 % gewonnen werden, was für eine *caged* Verbindung durchaus zufriedenstellend ist.

Caged Epinastin

Die Synthese von *N*-{[7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl]methoxycarbonyl}epinastin (**BCMACMOC-caged** Epinastin, **99**) erfolgte zunächst, wie in Abbildung 3-27 aufgeführt, analog der in Abbildung 3-17 gezeigten Synthese von **BCMACMOC-caged** Phenylethylamin aus dem Aktivester **56** und Epinastin. **99** wurde mit einer Ausbeute von 10 % erhalten. Hier führte der Einsatz von dem *O*-Cumarinylmethyl-*O*-succinimidylcarbonat **59** als Aktivester zu einer Verbesserung der Ausbeute auf 50 %. Die Abspaltung der *tert*-Butylgruppen mit TFA ergab *caged* Epinastin (**99**) mit einer Ausbeute von 77 %.

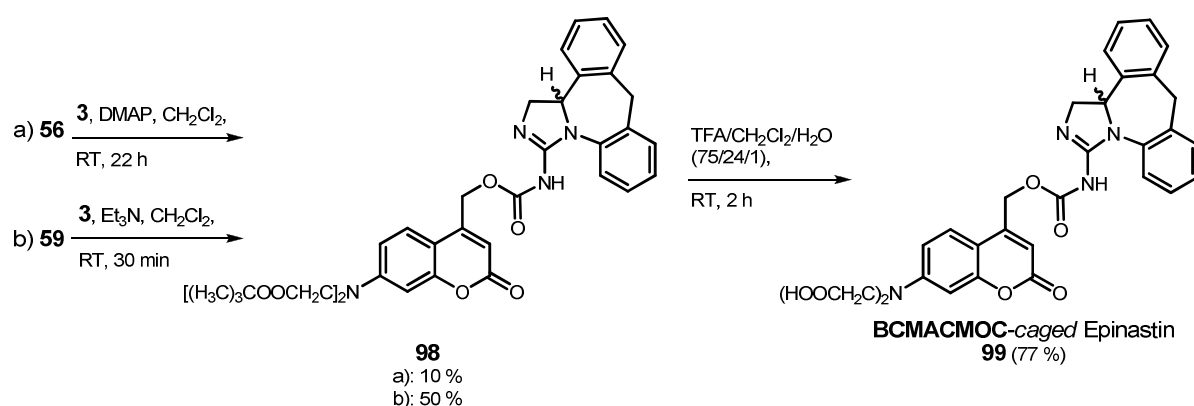


Abbildung 3-27: Synthese von **BCMACMOC-caged** Epinastin (**99**).

N-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]epinastin (**BHCMOC-caged** Epinastin, **100**) wurde unter den in Abbildung 3-28 aufgeführten Bedingungen durch Reaktion von dem Aktivester **60** mit Epinastin gewonnen. Die analoge Umsetzung von **61** mit Epinastin ergab *N*-[[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl]epinastin (**101**). Nach Abspaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppen wurde *N*-[[8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl]epinastin (**BBHCMOC-caged** Epinastin, **102**) mit einer Gesamtausbeute über beide Schritte von 25 % gewonnen.

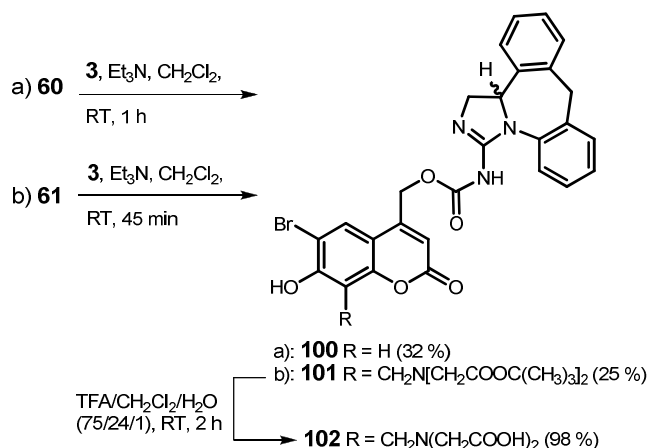


Abbildung 3-28: Synthese von **BHCMOC-caged** Epinastin (**100**) und **BBHCMOC-caged** Epinastin (**102**).

3.1.3.3 Caged PSIs

Caged Emetin

Bei der Synthese von *N*-[[7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl]methoxycarbonyl]emetin (**103**) (Abbildung 3-29) kamen neben Emetin auch wieder die beiden Aktivester **56** und **59** zum Einsatz. Auch in diesem Fall bringt die Verwendung von dem Succinimidylcarbonat **59** mit 64 % eine bessere Ausbeute als der Einsatz von **56**. Durch Abspaltung der *tert*-Butyl-Gruppen in **103** mit TFA wurde *N*-[[7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl]methoxycarbonyl]emetin (**BCMOC-caged** Emetin, **104**) mit einer Ausbeute von 61 % erhalten.

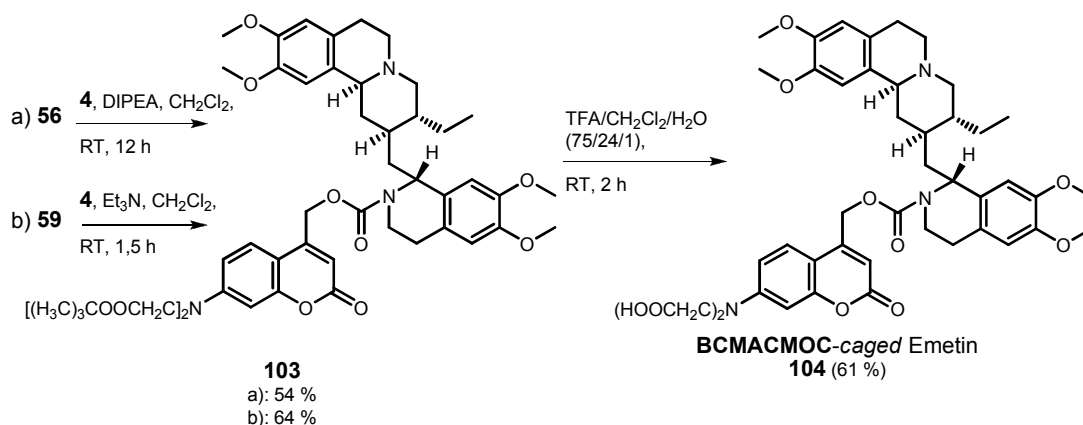


Abbildung 3-29: Synthese von **BCMOC-caged** Emetin (**104**).

Mit *N*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]emetin (**BHCMOC-caged Emetin**, **105**) wurde ein weiterer Phototrigger von Emetin hergestellt. Wie in Abbildung 3-30 gezeigt, wurde **105** sowohl aus dem Aktivester **57** als auch dem Aktivester **60** und Emetin gebildet. **105** wurde ausgehend von **57** und von **60** in guten Ausbeuten erhalten.

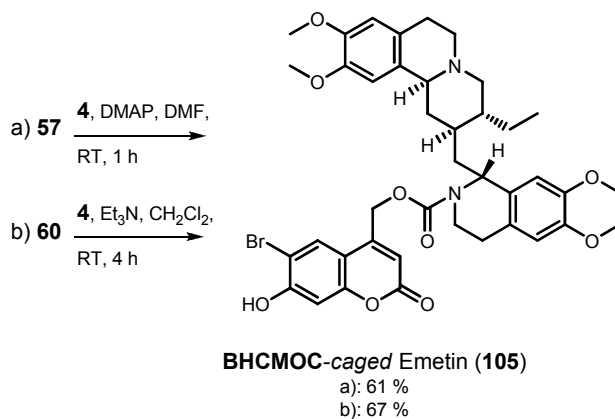


Abbildung 3-30: Synthese von **BHCMOC-caged Emetin (105)**.

N-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}-emetin (**106**) wurde, wie in Abbildung 3-31 aufgeführt, durch Umsetzung der Aktivester **58** und **61** mit Emetin hergestellt. Nach dem Entschützen der Säuregruppen in 8-Position des Cumarin-Gerüsts von **106** wurde *N*-{[8-[Bis(carbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}-emetin (**BBHCMOC-caged Emetin**, **107**) mit 82 % Ausbeute erhalten.

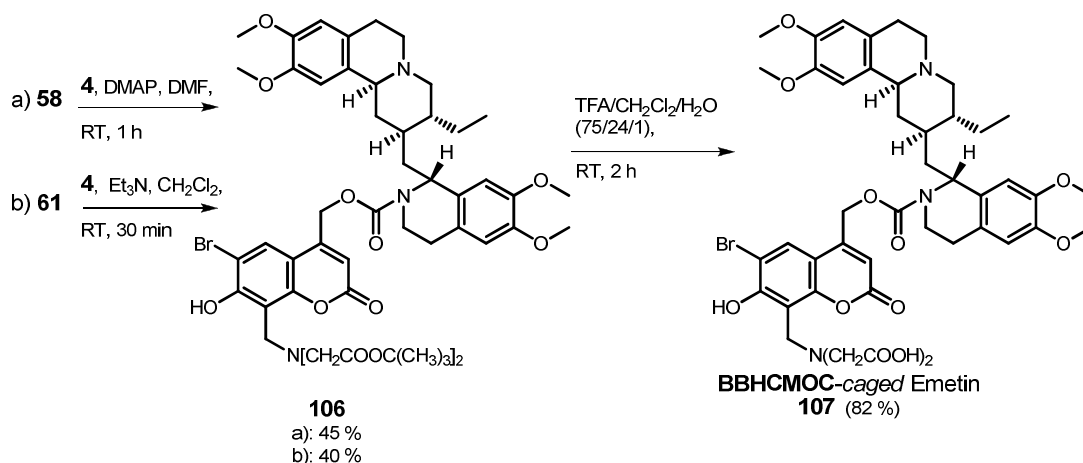
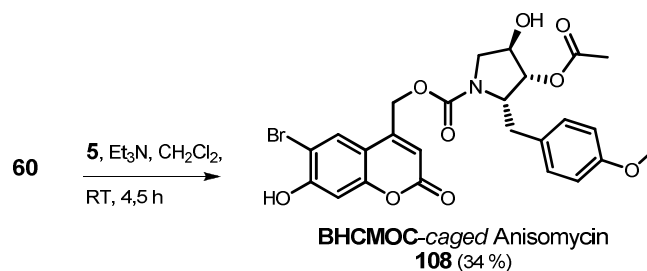


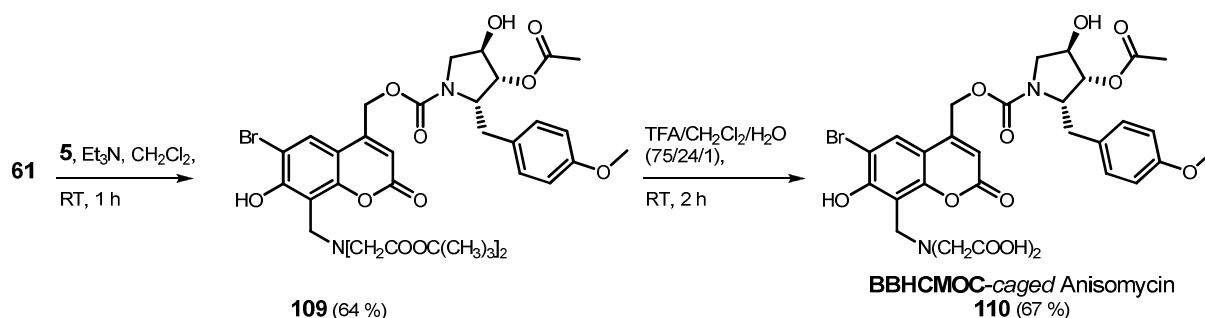
Abbildung 3-31: Synthese von **BBHCMOC-caged Emetin (107)**.

Caged Anisomycin

Die Synthese von *N*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]anisomycin (**BHCMOC-caged Anisomycin**, **108**) ist bereits von GOARD *et al.* publiziert worden.⁸⁸ Die Autoren haben den Alkohol **BHCM-OH (16)** mit Phosgen zu [(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]chlorformiat umgesetzt, welches dann mit Anisomycin (**5**) und Na₂CO₃ zur *caged* Verbindung **108** reagierte. Wir haben in unseren Synthesen auf den Einsatz von Phosgen verzichtet und konnten wie in Abbildung 3-32 gezeigt, **108** mit befriedigenden Ausbeuten durch Reaktion von **60** mit Anisomycin erhalten.

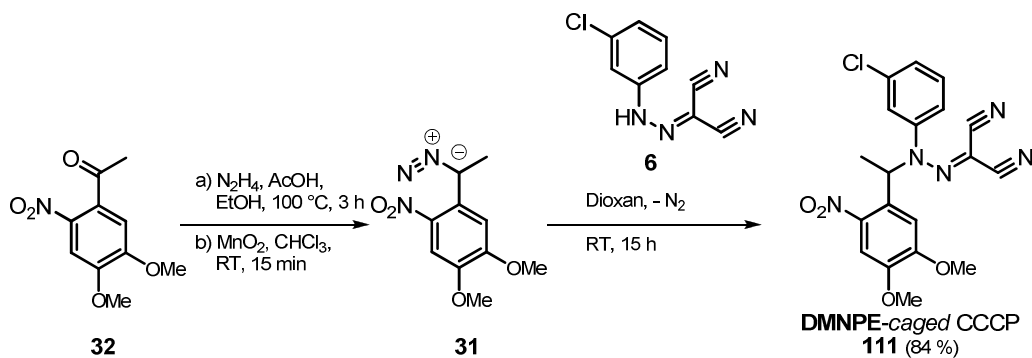
Abbildung 3-32: Synthese von **BHCmoc-caged Anisomycin (108)**.

Da das *caged* Anisomycin **108** eine sehr schlechte Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen aufwies, wurde *N*-{{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}anisomycin (**BBHCmoc-caged Anisomycin, 110**) synthetisiert (Abbildung 3-33). Zuerst wurde der Aktivester **61** mit Anisomycin (**5**) in Gegenwart von Et₃N zum *N*-{{8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}anisomycin (**109**) umgesetzt und dieses dann anschließend durch Hydrolyse der Esterbindungen in Position 8 des Coumarin-Gerüsts mit TFA in **110** überführt. Über beide Schritte konnte eine Ausbeute von 43 % erreicht werden.

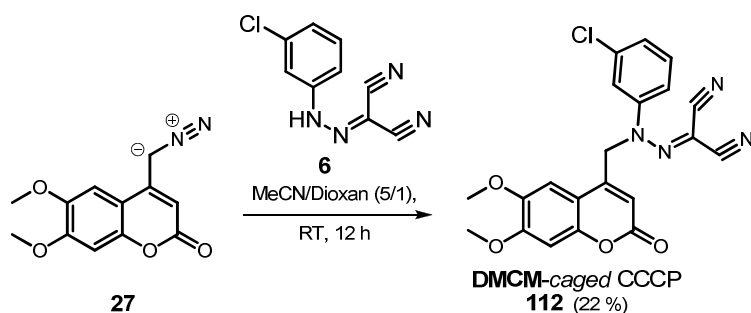
Abbildung 3-33: Synthese von **BBHCmoc-caged Anisomycin (110)**.

3.1.3.4 *Caged* CCCP

Der Protonophor CCCP (**6**) enthält eine NH-Funktion welche beim Design einer *caged* Verbindung zu schützen ist, da nur hier die biologisch relevante Reaktion stattfinden kann. Anfangs wurde versucht, diese Imino-Gruppierung mit Hilfe des vom Coumarin abgeleiteten Aktivesters **60** umzusetzen. Trotz Variation der eingesetzten Basen, der Lösungsmittel oder der Temperatur konnte jedoch das gewünschte Produkt, **BHCmoc-caged CCCP**, nicht erhalten werden. Es wurde aber die Entstehung vieler verschiedener anderer Verbindungen beobachtet, was darauf zurückzuführen sein dürfte, dass das Cyanokonstrukt recht reaktiv ist und unter den gewählten basischen Reaktionsbedingungen Nebenreaktionen eingeht. Somit mußte eine andere Strategie zur Herstellung einer *caged* Verbindung von CCCP gewählt werden. Unter anderem bot sich die Alkylierung mit einer Nitrobenzyl-Diazo-Verbindung an, beispielsweise dem 1998 eingeführten **DMNPE-N₂**.^{24b} Analog zur Synthese von **DMNPE-caged cyclischen Nukleotiden**^{24b} wurde 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl-*caged* CCCP (**DMNPE-caged CCCP, 111**) synthetisiert (siehe Abbildung 3-34). **111** wurde mit guten Ausbeuten erhalten. Damit wurde erstmals eine NH-Verbindung mit einem Nitrobenzyl-Diazo-Derivat in einen Phototrigger überführt.

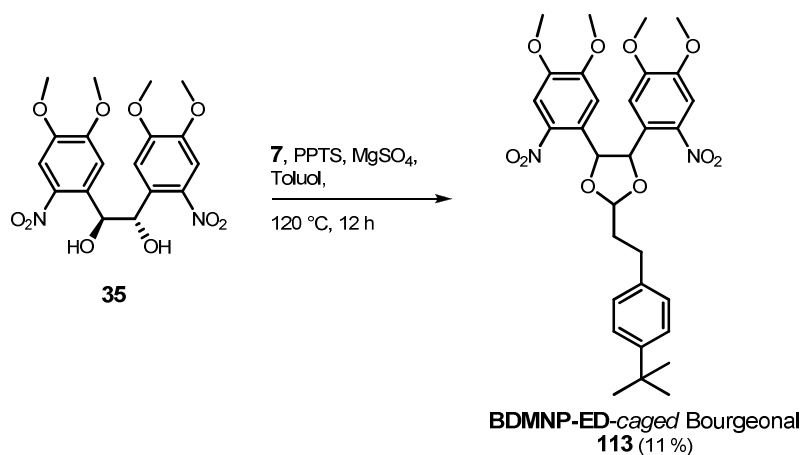
Abbildung 3-34: Synthese von **DMNPE-caged CCCP (111)**.

Ebenfalls wurde der Versuch unternommen, eine **CM**-Schutzgruppe am CCCP einzuführen. Hierfür wurde **DMCM-N₂ (27)** mit CCCP umgesetzt. Bei dieser Reaktion entstand mit 22%ig. Ausbeute das in Abbildung 3-35 gezeigte Carbonylcyanid-*N*-(3-chlorphenyl)-*N*-[(6,7-dimethoxycumarin-4-yl)methyl]hydrazon (**DMCM-caged CCCP, 112**).

Abbildung 3-35: Synthese von **DMCM-caged CCCP (109)**.

3.1.3.5 Caged Bourgeonal

Bourgeonal (**7**) wurde durch die in Abbildung 3-36 gezeigte und bei anderen Aldehyden erfolgreich praktizierte Acetalisierung^{18,40,104} mit **BDMNP-ED (35)** zu 4,5-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (**BDMNP-ED-caged Bourgeonal, 113**) umgesetzt.

Abbildung 3-36: Synthese von **BDMNP-ED-caged Bourgeonal (113)**.

Zur Synthese eines besser wasserlöslichen *caged* Bourgeonal-Derivates wurde das in dieser Arbeit eingeführte **BBMCMNP-ED** (**40**) in Analogie zu dem oben aufgeführten Verfahren gleichfalls mit Bourgeonal (**7**) in Gegenwart von PPTS bei 120 °C umgesetzt. Nach Aufarbeitung wurde 4,5-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (**114**) mit 21 % Ausbeute isoliert. Nach hydrolytischer Spaltung der Methylester-Gruppierungen mit LiOH wurde 4,5-Bis[4,5-bis(carboxymethoxy)-2-nitrophenyl]-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (**BBCMNP-ED-caged Bourgeonal**, **115**) mit 82 % Ausbeute erhalten.

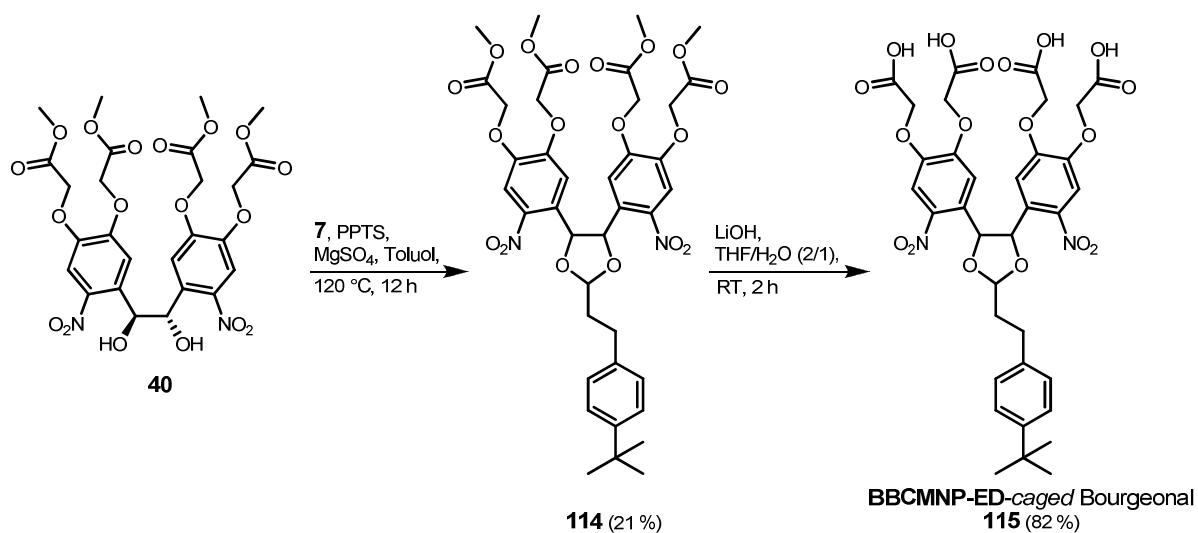


Abbildung 3-37: Synthese von **BBCMNP-ED-caged Bourgeonal** (**115**).

3.2 Eigenschaften der *caged* Verbindungen

In diesem Kapitel werden die unter 3.1 synthetisierten *caged* Verbindungen **68-73**, **77-79**, **81**, **82**, **89**, **97**, **99**, **100**, **102**, **104**, **105**, **107**, **108**, **110-113** und **115** chemisch und photochemisch charakterisiert. Dazu werden die im Verlauf dieser Arbeit ermittelten Löslichkeits-, Hydrolyse-, Absorptions-, Photolyse- und Fluoreszenzeigenschaften vorgestellt. Auch die Abhängigkeit der Eigenschaften einiger Verbindungen vom pH-Wert wird gezeigt. Weiterhin wird am Beispiel von **BBHCMOC-caged** Emetin (**107**) erstmals die 2-Photonen-Anregbarkeit des **BBHCMOC**-Chromophors demonstriert. Mit Hilfe zeitaufgelöster Fluoreszenz- und IR-Messungen wird erstmals die Kinetik der Photolyse von (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl-*caged* Aminoverbindungen an einigen Modelverbindungen näher untersucht.

3.2.1 Löslichkeiten und Hydrolysestabilitäten

Eine wichtige Anforderung an neu entwickelte *caged* Biomoleküle ist ihre ausreichende Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen. Unter der Löslichkeit versteht man die maximal erreichbare Konzentration, auch Sättigungskonzentration c_s genannt, einer Substanz im verwendeten Lösungsmittel.

In dieser Arbeit wurden die c_s -Werte der *caged* Verbindungen von den Biomolekülen **1-5** in MeCN/Phosphatpuffer (5/95) bei pH = 7,2 bestimmt, da diese Bedingungen den zu untersuchenden biologischen Systemen am nächsten kamen. Die *Caging*-Gruppe sollte die Löslichkeit der Biomoleküle idealerweise nicht verringern, sondern verbessern. Das gelang, wie den c_s -Werten in Tabelle 3-1 zu entnehmen ist, besonders gut mit den **BCMACMOC**- und **BBHCMOC**-Schutzgruppen. Hier liegt die Löslichkeit der *caged* Verbindungen im mM-Bereich. Auch das mit **PBHCMOC**- und **DBHCMOC**-geschützte Octopamin weist mit 10 bzw. 8 mM eine sehr hohe Löslichkeit auf. Nur die mit der **BHCMOC**-Schutzgruppe maskierten Verbindungen von **1-5** zeigen eine relativ geringe Löslichkeit. Somit können diese Verbindungen nur in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden.

Bei der *caged* CCCP-Verbindung **111** wurde, trotz der relativ hohen Wasserlöslichkeit von dem Protonophor CCCP, nur eine geringe Löslichkeit erreicht. Die niedrige Löslichkeit von 3 μ M des **BDMNP-ED-caged** Bourgeonal (**113**) konnte durch die Einführung der neu entwickelten **BBCMNP-ED**-Schutzgruppe auf $\gg 50$ μ M erhöht werden. Der genaue c_s -Wert von **115** konnte auf Grund nicht ausreichend zur Verfügung stehenden Substanzmengen nicht genauer bestimmt werden, liegt aber deutlich höher als 50 μ M.

Tabelle 3-1: Sättigungskonzentrationen (c_s) der hergestellten *caged* Verbindungen in MeCN/Phosphatpuffer (5/95), pH = 7,2.

| Nr. | Verbindung | c_s [μM] |
|------------|---|-------------------------|
| 70 | BCMACMOC-<i>caged</i> Dopamin | 1×10^4 |
| 73 | BHCMOC-<i>caged</i> Dopamin | 1×10^2 |
| 79 | BBHCMOC-<i>caged</i> Dopamin | 1×10^4 |
| 69 | BCMACMOC-<i>caged</i> Octopamin | n.b. |
| 72 | BHCMOC-<i>caged</i> Octopamin | 5×10^2 |
| 78 | BBHCMOC-<i>caged</i> Octopamin | 2×10^3 |
| 89 | O^1-BHCMOC-<i>caged</i> Octopamin | $5,5 \times 10^2$ |
| 97 | O^2-BHCMOC-<i>caged</i> Octopamin | 5×10^3 |
| 81 | PBHCMOC-<i>caged</i> Octopamin | 1×10^4 |
| 82 | DBHCMOC-<i>caged</i> Octopamin | 8×10^3 |
| 104 | BCMACMOC-<i>caged</i> Emetin | 5×10^3 |
| 105 | BHCMOC-<i>caged</i> Emetin | $1,4 \times 10^2$ |
| 107 | BBHCMOC-<i>caged</i> Emetin | 1×10^4 |
| 99 | BCMACMOC-<i>caged</i> Epinastin | n.b. |
| 100 | BHCMOC-<i>caged</i> Epinastin | 1×10^2 |
| 102 | BBHCMOC-<i>caged</i> Epinastin | $\geq 1 \times 10^4$ |
| 108 | BHCMOC-<i>caged</i> Anisomycin | 9×10^1 |
| 110 | BBHCMOC-<i>caged</i> Anisomycin | $\geq 1,1 \times 10^4$ |
| 68 | BCMACMOC-<i>caged</i> Phenylethylamin | $\geq 2,4 \times 10^3$ |
| 71 | BHCMOC-<i>caged</i> Phenylethylamin | $4,5 \times 10^2$ |
| 77 | BBHCMOC-<i>caged</i> Phenylethylamin | $\geq 1 \times 10^4$ |
| 111 | DMNPE-<i>caged</i> CCCP | 9 |
| 113 | BDMNP-ED-<i>caged</i> Bourgeonal* | 3 |
| 115 | BBCMNP-ED-<i>caged</i> Bourgeonal* | $\gg 5 \times 10^1$ |

*in MeCN/HEPES (5/95), pH = 7,2; n.b. nicht bestimmt

Die hydrolytische Stabilität in wässrigen Medien ist ein weiterer wichtiger Parameter bei der Entscheidung, ob eine der *caged* Verbindungen zum Einsatz unter physiologischen Bedingungen geeignet ist. Die Hydrolyse der hier diskutierten *caged* Verbindungen hätte die unkontrollierte Freisetzung der Biomoleküle zur Folge, d.h. es handelt sich um eine Konkurrenzreaktion zur Photolyse. Dies kann die gewünschte Steuerung der Freisetzung der Biomoleküle beeinflussen. Daher wurden alle in dieser Arbeit synthetisierten *caged* Verbindungen hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber Hydrolyse untersucht. Dazu wurden Lösungen der Verbindungen 24 h bei RT im Dunkeln stehen gelassen und anschließend mittels HPLC hinsichtlich der Abnahme der Konzentrationen der *caged* Verbindungen untersucht. Zusätzlich wurde auch nach eventuell gebildeten Peaks der Biomoleküle bzw. von Derivaten der Chromophore gesucht. Bei allen *caged* Verbindungen bis auf die Derivate **70**, **73** und **79** konnte nach 24 h keine nachweisbare Abnahme der Konzentration gefunden werden. Dies lässt auf eine Halbwertszeit der Hydrolyse von mehr als 1000 h schließen. Bei den *caged* Dopamin-

Verbindungen **70**, **73** und **79** wurde in der Pufferlösung eine Abnahme der Konzentration bis zu 90 % gefunden. Es konnte aber keine Bildung von dem entsprechenden 4-(Hydroxymethyl)cumarin bzw. von Dopamin beobachtet werden. Bei der Bestimmung der hydrolytischen Stabilität in MeCN/H₂O (5/95) wurde keine Konzentrationsabnahme der *caged* Verbindungen innerhalb von 48 h beobachtet. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Konzentrationsabnahme nicht solvolytisch bedingt ist, sondern es sich dabei um eine andere Nebenreaktion handelt, die nur in der Pufferlösung stattfindet. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle **CM-caged** Derivate in Pufferlösungen eine hohe hydrolytische Stabilität aufweisen und problemlos unter physiologischen Bedingungen eingesetzt werden können.

3.2.2 Absorptionsspektroskopische Charakterisierung

Eine für *caged* Biomoleküle sehr wichtige Eigenschaft ist eine langwellige Absorption des Schutzgruppen-Chromophors. Zusätzlich sollte der Extinktionskoeffizient, ϵ_{\max} , in diesem Bereich möglichst hoch sein, damit eine effiziente Photospaltung möglich wird. Die Langwelligkeit der Absorption ist notwendig, da bei der Freisetzung der Biomoleküle durch Bestrahlung mit Licht möglichst keine anderen Zellbestandteile angeregt und dadurch eventuell geschädigt werden sollen. Die Wellenlänge des eingesetzten Lichtes sollte >320 nm liegen, d.h. der Schutzgruppen-Chromophor sollte >320 nm anregbar sein.

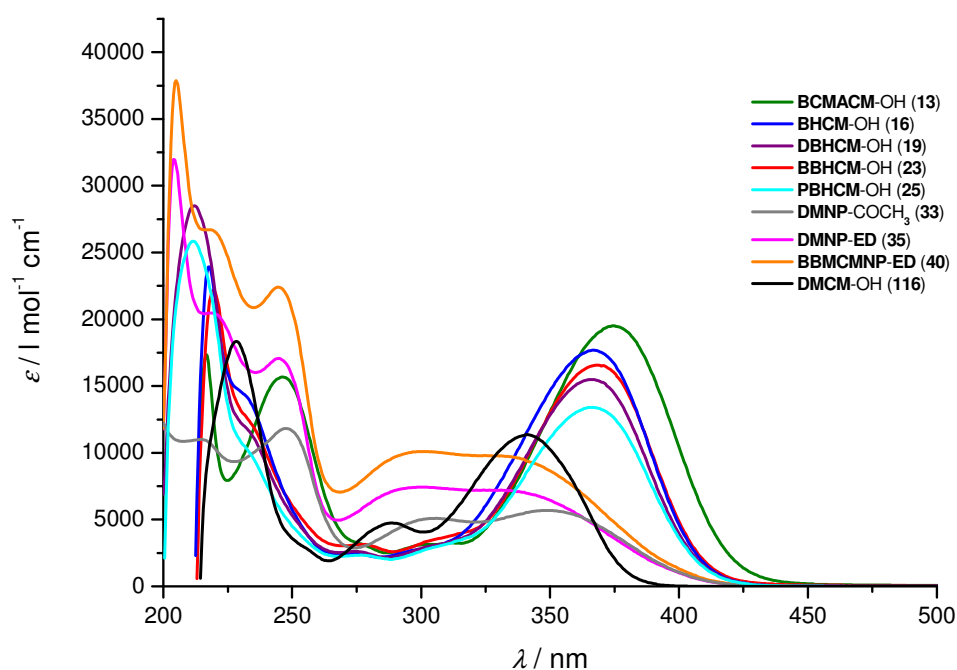
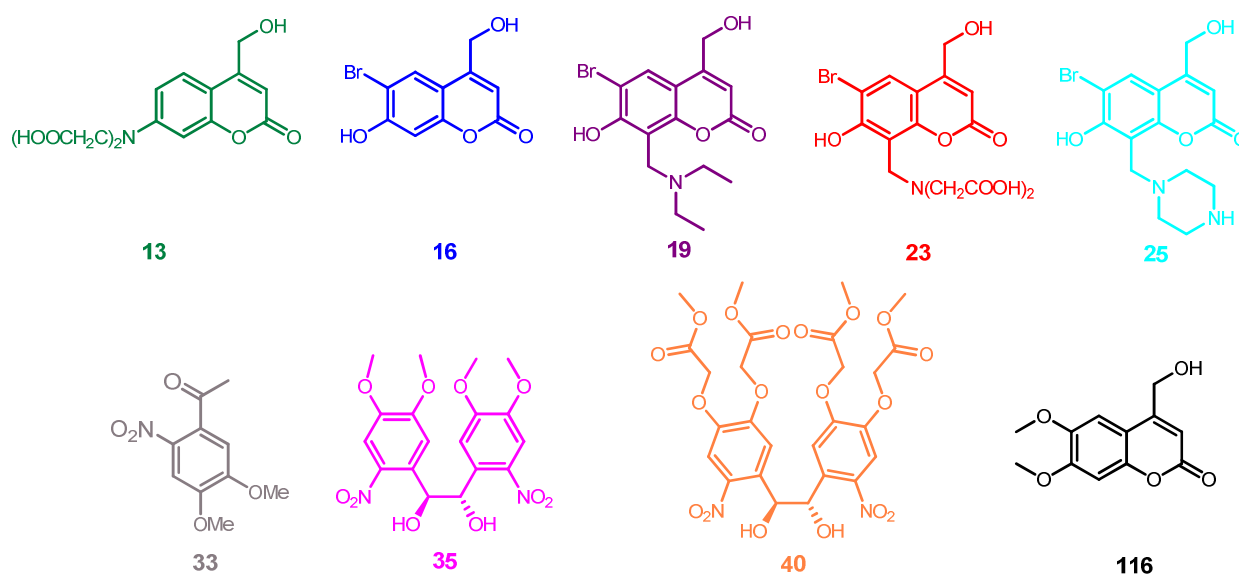


Abbildung 3-38: Absorptionsspektren ausgewählter **CM**- und **NB**-Chromophore.

Die hier bearbeiteten Biomoleküle **1-5** und **7** absorbieren selbst nur im kurzwelligen Bereich des Lichtes (200 bis 280 nm). Daher stammt die langwellige Absorption der aus ihnen synthetisierten *caged* Verbindungen ausschließlich von den eingeführten photolabilen Schutzgruppen. In Abbildung 3-38 werden die UV/Vis-Spektren von 4-(Hydroxymethyl)cumarinen und von den **NB**-Verbindungen **33**, **35** und **40** gezeigt, die näherungsweise denen der entsprechenden Chromophore in den *caged* Verbindungen gleichen.

Die größten λ_{\max} -Werte weisen die 4-(Hydroxymethyl)cumarine **13**, **16**, **19**, **23** und **25** (vgl. Tabelle 3-2) auf. Sie absorbieren sowohl im Bereich von 200 - 280 nm als auch im langwelligeren Bereich von 320 - 450 nm. Die in Abbildung 3-38 aufgezeigte langwellige Absorptionsbande der Chromophore mit **CM**-Gerüst zeichnet sich zusätzlich durch Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) im Bereich von 15500 bis 19500 l mol⁻¹ cm⁻¹ aus. Die ϵ_{\max} -Werte sind mehr als doppelt so hoch wie die von den in dieser Arbeit eingesetzten **NB**-Verbindungen. Eine Ausnahme bildet der **CM**-Alkohol **25**, der nur über einen ϵ_{\max} -Wert von 13400 l mol⁻¹ cm⁻¹ verfügt.

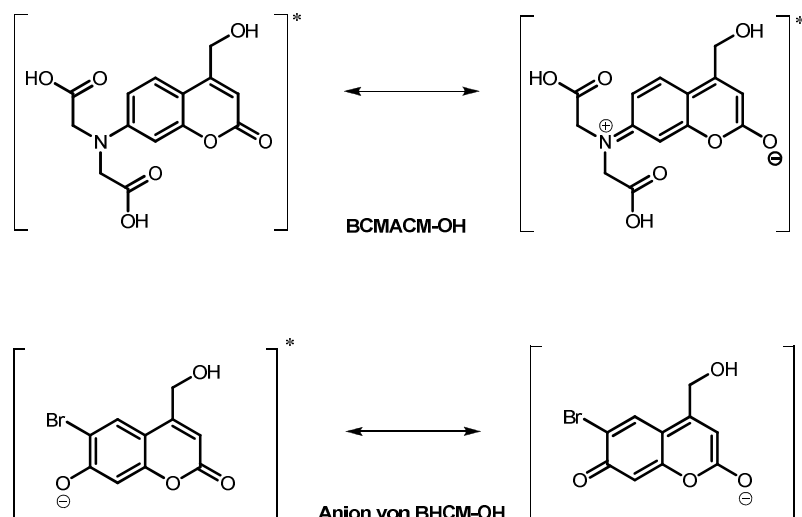
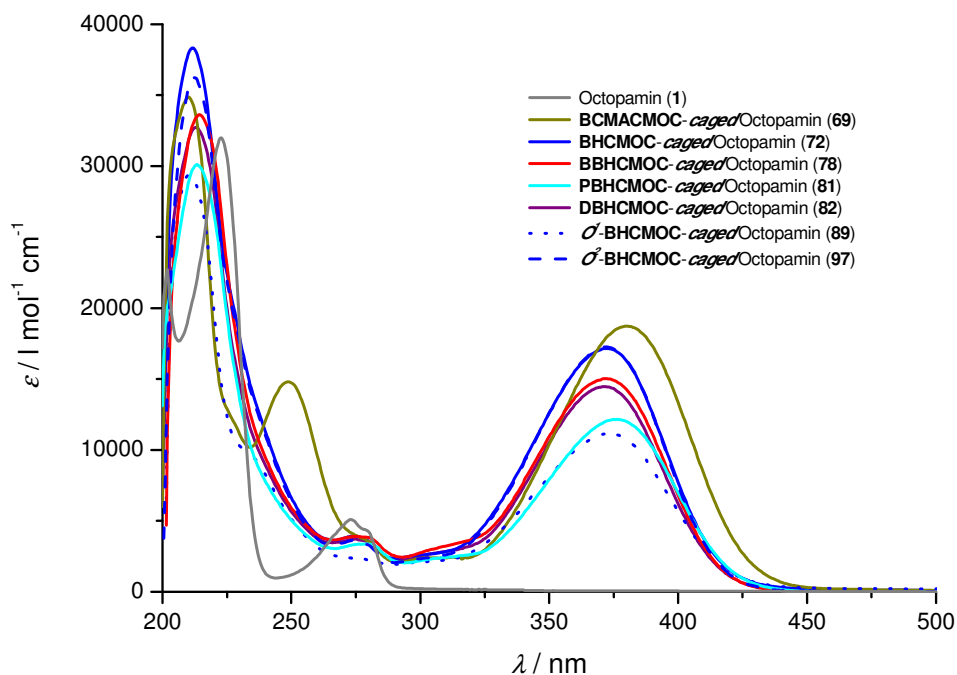
Tabelle 3-2: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{\max}) und Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) in MeCN/Phosphatpuffer (5/95), pH = 7,2.

| Nr. | Verbindung | λ_{\max} [nm] | ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹] |
|------------|------------------------------|-----------------------|---|
| 13 | BCMCM-OH | 374 | 19500 |
| 16 | BHCM-OH | 367 | 17600 |
| 19 | DBHCM-OH | 367 | 15500 |
| 23 | BBHCM-OH | 369 | 16600 |
| 25 | PBHCM-OH | 366 | 13400 |
| 33 | DMNP-COCH₃ | 349 | 5700 |
| 35 | BDMNP-ED* | 337 | 7100 |
| 40 | BBMCMNP-ED* | 335 | 9700 |
| 116 | DMCM-OH | 341 | 11400 |

* in MeCN/HEPES (5/95) pH = 7,2.

Beim Cumarin ist die elektronische Konfiguration des S₁-Zustandes vom n π^* -Typ und die des S₂-Zustandes vom $\pi\pi^*$ -Typ.¹²⁰ Die langwellige Absorptionsbande der **CM**-Chromophore ist dem $\pi\pi^*$ -Übergang zuzuordnen.³¹ Die Einführung von Substituenten am Cumarin-Gerüst hat eine Absenkung des $\pi\pi^*$ -Übergangs zur Folge. Da der n π^* -Übergang keine Veränderung zeigt, kommt es zu einer Niveauinversion. Die Absorptionsbande des n π^* -Übergangs ist somit deutlich kurzwelliger als die des $\pi\pi^*$ -Überganges und wird wegen ihrer geringen Übergangswahrscheinlichkeit in den meisten Fällen von der $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande überdeckt.

Die Einführung von Elektronendonatoren in die 7-Position des **CM**-Gerüsts bewirkt durch eine intramolekulare Ladungsübertragung (*intramolecular charge transfer*, ICT) im angeregten Zustand eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums und eine Erhöhung des Extinktionskoeffizienten.^{31,36a} Dieser auch als *push-pull*-Effekt bezeichnete Zusammenhang bei dem die Carbonylgruppe des Lactons als Elektronenakzeptor dient, wird in Abbildung 3-39 am Beispiel von **BCMCM**- und **BHCM**-OH gezeigt.

Abbildung 3-39: Intramolekulare Ladungsübertragung in **BCMACM-OH** und **BHCM-OH**.Abbildung 3-40: Absorptionsspektren aller synthetisierten *caged* Octopamine.

In Abbildung 3-40 werden die UV/Vis-Spektren aller in dieser Arbeit hergestellten **CM-caged** Octopamin-Verbindungen gezeigt. Sie unterscheiden sich von den in Abbildung 3-40 gezeigten Spektren der **CM-Alkohole** nur in der Absorption im kurzwelligen Bereich zwischen 200 und 270 nm. Näherungsweise entsprechen sie einer Überlagerung der Spektren der jeweiligen Alkohole und dem Spektrum des Octopamins, was bei bichromophoren Systemen, die nicht konjugiert sind, in der Regel auch der Fall ist. Die ermittelten langwelligsten Absorptionsmaxima, die in Tabelle 3-3 aufgeführt sind, liegen zwischen 371 und 380 nm und die Extinktionskoeffizienten zwischen 14500 und 19000 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Der Extinktionskoeffizient von Verbindung **81** ist wie der des **CM-Alkohols 25** niedriger.

Alle *caged* Octopamin-Verbindungen sind langwellig anregbar und besitzen verhältnismäßig hohe Extinktionskoeffizienten.

Tabelle 3-3: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{\max}) und Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) von *caged* Octopaminen in MeCN/Phosphatpuffer (5/95), pH = 7,2.

| Nr. | Verbindung | λ_{\max} [nm] | ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹] |
|-----|--|-----------------------|---|
| 69 | BCMACMOC - <i>caged</i> Octopamin | 380 | 18700 |
| 72 | BHCMOC - <i>caged</i> Octopamin | 373 | 17150 |
| 78 | BBHCMOC - <i>caged</i> Octopamin | 372 | 15000 |
| 81 | PBHCMOC - <i>caged</i> Octopamin | 375 | 12150 |
| 82 | DBHCMOC - <i>caged</i> Octopamin | 371 | 14500 |
| 89 | <i>O</i> ¹ - BHCMOC - <i>caged</i> Octopamin | 374 | 11150 |
| 97 | <i>O</i> ² - BHCMOC - <i>caged</i> Octopamin | 372 | 17250 |

In Abbildung 3-41 werden die UV/Vis-Spektren der **BCMACMOC**-, **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-*caged* Derivate der Verbindungen **2-5** und von Phenylethylamin (**64**) gezeigt. Auch hier liegen erwartungsgemäß alle λ_{\max} -Werte im Bereich zwischen 372 und 387 nm. Die λ_{\max} -Werte der **BCMACMOC**-Phototrigger sind gegenüber denen der **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-Derivate leicht bathochrom verschoben. Die Extinktionskoeffizienten, die in Tabelle 3-4 aufgelistet sind, liegen fast alle im erwarteten Bereich von 15000 bis 19500 l mol⁻¹ cm⁻¹. Nur die ϵ_{\max} -Werte der Verbindungen **102** und **105** sind kleiner (13000 bzw. 13300 l mol⁻¹ cm⁻¹).

Alle 14 in Tabelle 3-4 aufgeführten *caged* Verbindungen eignen sich hinsichtlich ihrer Absorptionseigenschaften zum Einsatz als Phototrigger.

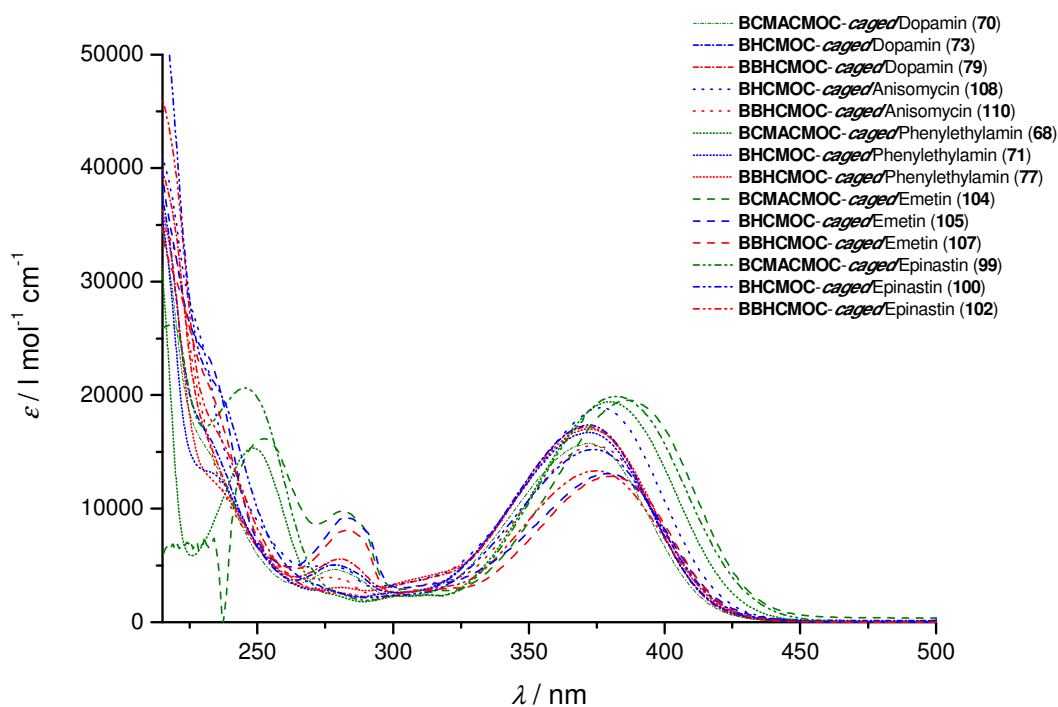


Abbildung 3-41: Absorptionsspektren der **CM**-*caged* Derivate der Verbindungen **2-5** und **64**.

Tabelle 3-4: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{\max}) und Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) von verschiedenen **CM-caged** Verbindungen in MeCN/Phosphatpuffer (5/95), pH = 7,2.

| Nr. | Verbindung | λ_{\max} [nm] | ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹] |
|------------|--------------------------------------|-----------------------|---|
| 70 | BCMCMOC-caged Dopamin | 380 | 15700 |
| 73 | BHCMOC-caged Dopamin | 372 | 17400 |
| 79 | BBHCMOC-caged Dopamin | 372 | 18000 |
| 104 | BCMCMOC-caged Emetin | 387 | 19500 |
| 105 | BHCMOC-caged Emetin | 379 | 13000 |
| 107 | BBHCMOC-caged Emetin | 380 | 15700 |
| 99 | BCMCMOC-caged Epinastin | 383 | 16200 |
| 100 | BHCMOC-caged Epinastin | 374 | 15200 |
| 102 | BBHCMOC-caged Epinastin | 375 | 13300 |
| 108 | BHCMOC-caged Anisomycin | 376,5 | 18900 |
| 110 | BBHCMOC-caged Anisomycin | 374 | 15600 |
| 68 | BCMCMOC-caged Phenylethylamin | 380,5 | 19400 |
| 71 | BHCMOC-caged Phenylethylamin | 372 | 16700 |
| 77 | BBHCMOC-caged Phenylethylamin | 372 | 17000 |

Die langwelligste Absorptionsbande der beiden **NB**-Chromophore **35** und **40** (vgl. Abbildung 3-42) liegt zwischen 270 und 400 nm, ist deutlich breiter und hat mit einem ϵ_{\max} -Wert von <10000 l mol⁻¹ cm⁻¹ einen deutlich geringeren Extinktionskoeffizienten als die langwelligste Absorptionsbande der vorstehend aufgeführten **CM**-Chromophore. Das langwelligste Absorptionsmaximum liegt bei den Chromophoren **35** und **40** bei 335 nm. Der λ_{\max} -Wert der *caged* Bourgeonal-Derivate **113** und **115** beträgt 348 nm. Somit führt die Ausbildung der Dioxolanstruktur zu einer bathochromen Verschiebung von λ_{\max} um 13 nm.

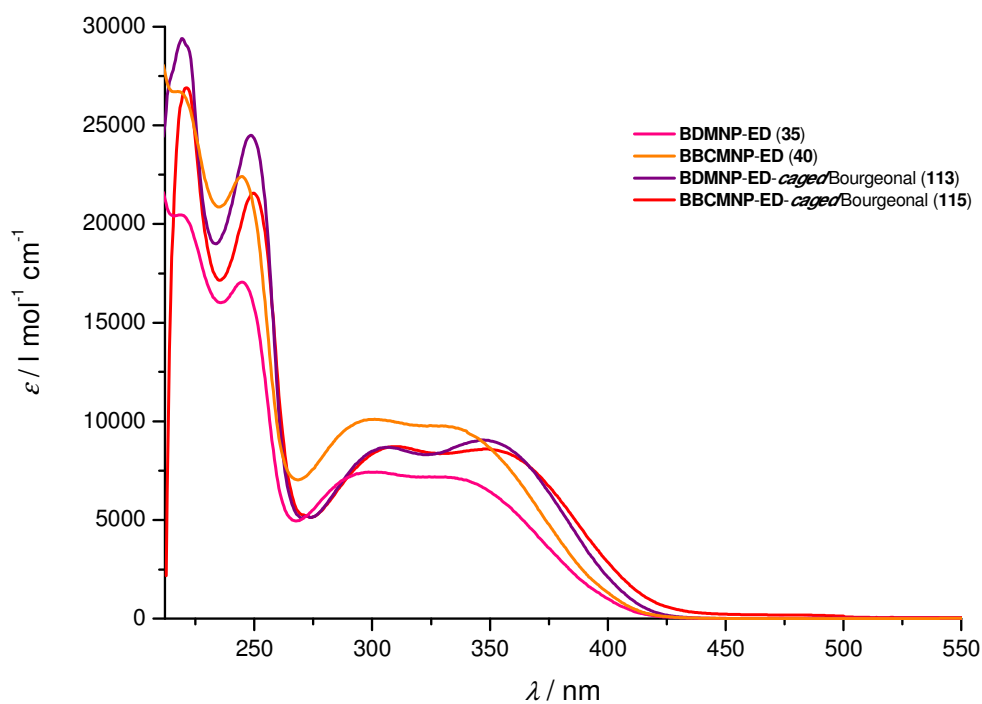
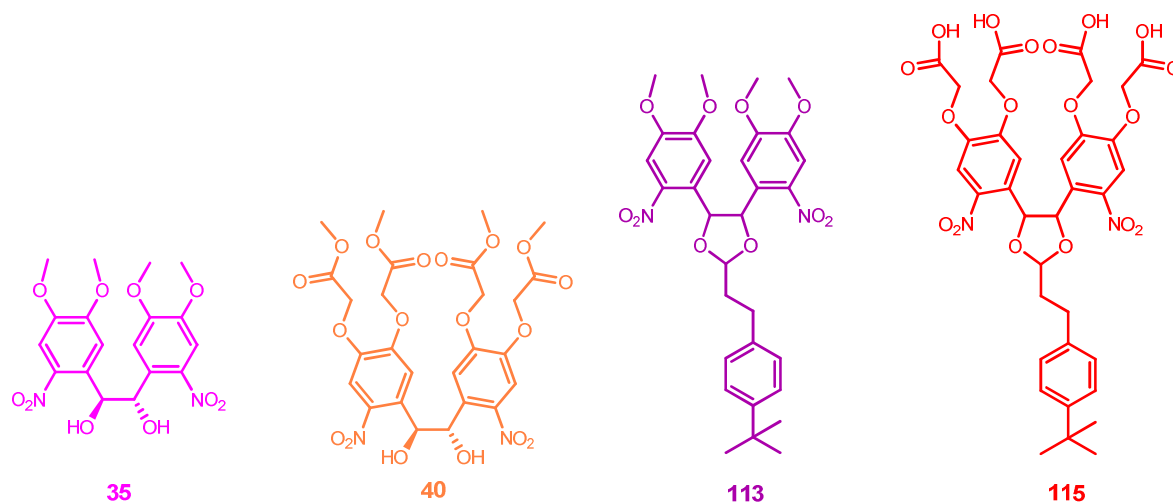


Abbildung 3-42: Absorptionsspektren der Ethandiole **35** und **40** und der *caged* Bourgeonal-Verbindungen **113** und **115**.

Den in Tabelle 3-5 aufgeführten Werten der Extinktionskoeffizienten, die zwischen 7000 und 9700 l mol⁻¹ cm⁻¹ liegen, ist zu entnehmen, dass weder die Einführung der Carboxymethoxy-Substituenten in die 4- und 5- Position der **NB**-Bausteine noch die Ausbildung der Dioxolan-Struktur zu einer Erhöhung der Extinktionskoeffizienten führt. Somit unterscheiden sich die hergestellten *caged* Bourgeonale **113** und **115** fast nicht in ihren absorptionspektroskopischen Eigenschaften.

Sowohl **113** als auch **115** zeigen ein ausreichend langwelliges Absorptionsmaximum und einen ausreichend hohen Extinktionskoeffizienten um den gestellten Anforderungen als *caged* Verbindung gerecht zu werden.

Tabelle 3-5: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{\max}) und Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) der Ethandiole **35** und **40** und der *caged* Bourgeonale **113** und **115** in MeCN/HEPES (5/95), pH = 7,2.

| Nr. | Verbindung | λ_{\max} [nm] | ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹] |
|------------|------------------------------------|-----------------------|---|
| 35 | BDMNP-ED | 337 | 7100 |
| 40 | BBMCMNP-ED | 335 | 9700 |
| 113 | BDMNP-ED-caged Bourgeonal | 349 | 9050 |
| 115 | BBMCMNP-ED-caged Bourgeonal | 348 | 8200 |

CCCP (**6**) ist das einzige der bearbeiteten Biomoleküle, das durch sein konjugiertes π -System eine sehr hohe ($\epsilon_{\max} = 24400 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) langwellige ($\lambda_{\max} = 384 \text{ nm}$) Absorption aufweist (Abbildung 3-43). Die eingesetzten Schutzgruppen-Chromophore selbst besitzen ein deutlich hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum bei 349 nm für **33** und 341 nm für **116**. Der Extinktionskoeffizient von **33** (Tabelle 3-6) ist mit $5700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gering aber im erwarteten Bereich für **DMNB**-Verbindungen. Der ϵ_{\max} -Wert von **DMCM-OH** liegt bei $11400 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Die Einführung der photolabilen Schutzgruppen führt zu einer starken hypsochromen Verschiebung des langwelligsten Absorptionsmaximums von CCCP. λ_{\max} liegt im Fall von **DMCM-caged** CCCP mit 362 nm immer noch im langwelligen Bereich mittig zwischen den Ausgangsverbindungen. Beim **DMNPE-caged** CCCP ist λ_{\max} sogar nach 305 nm hypsochrom verschoben, hat aber eine sehr breite Absorptionsbande, was es ermöglicht das Molekül im Bereich von 330 nm bis 350 nm anzuregen. Der in Tabelle 3-6 aufgeführte Extinktionskoeffizient von Verbindung **111** liegt mit $12600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nahe an dem ϵ_{\max} -Wert von **DMCM-OH**.

Tabelle 3-6: Langwelligste Absorptionsmaxima (λ_{\max}) und Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) von CCCP (**6**), der *Caging*-Reagenzien **33** und **116** und der *caged* CCCP-Verbindungen **111** und **112** in MeCN/H₂O (1/1), pH = 7,2.

| Nr. | Verbindung | λ_{\max} [nm] | ϵ_{\max} [l mol ⁻¹ cm ⁻¹] |
|------------|------------------------------|-----------------------|---|
| 6 | CCCP | 384 | 24500 |
| 33 | DMNP-COCH₃ | 349 | 5700 |
| 111 | DMNPE-caged CCCP | 305 | 18600 |
| 112 | DMCM-caged CCCP | 362 | 12600 |
| 116 | DMCM-OH | 341 | 11400 |

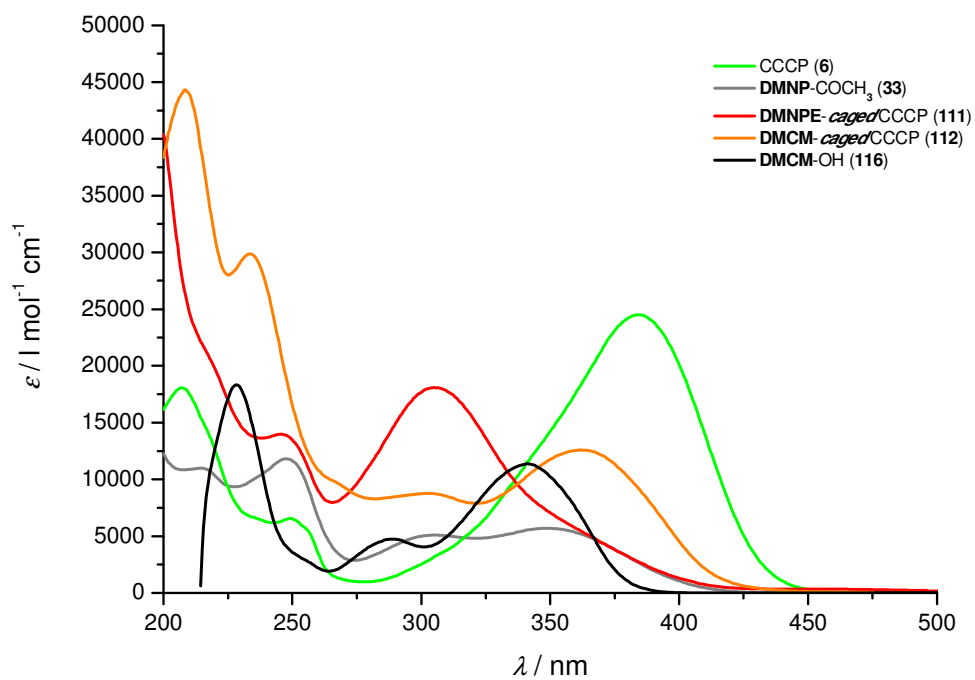
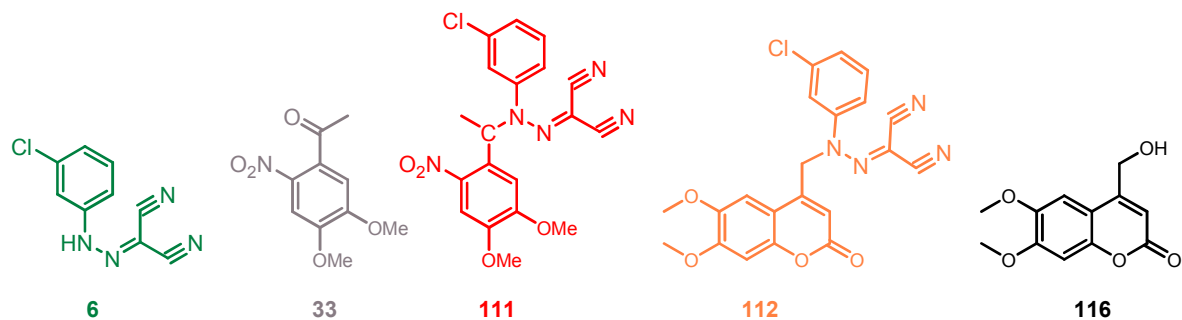


Abbildung 3-43: Absorptionsspektren von CCCP (**6**), der *Caging*-Reagenzien **33** und **116** und der *caged* CCCP-Verbindungen **111** und **112**.

3.2.3 Mechanismus der Photospaltung und photochemische Quantenausbeuten

Bei der Bestrahlung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Cumarinylmethoxycarbonyl-*caged* Verbindungen wurden das entsprechende Biomolekül, der jeweilige Cumarinylmethyl-Alkohol sowie CO_2 gebildet. Der Mechanismus der Photospaltung von (Cumarin-4-yl)methyl-geschützten Estern wurde 1999 von SCHADE *et al.* aufgeklärt.^{36a} Die Autoren fanden den in Abbildung 1-7 gezeigten Photolysemechanismus, wobei sie durch Messungen mit ^{18}O -markiertem Wasser nachweisen konnten, dass die Hydroxygruppe am 4-Methyl-Substituenten des Cumarins im gebildeten **CM**-Alkohol aus dem Lösungsmittel stammt. Dementsprechend muss die Sollbruchstelle der Photolyse zwischen der Cumarinylmethyl-Gruppe und dem Säurerest liegen. Es wird angenommen, dass die Anregung des Cumarinchromophors mit Licht zu einer heterolytischen Bindungsspaltung führt. Auf Grund dieser Erkenntnisse und der weiterführenden Arbeiten von SCHMIDT *et al.*⁴¹ kann von einem $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus der Photolyse ausgegangen werden.⁴¹ Im Anschluß an die heterolytische Bindungsspaltung kommt es zur Stabilisierung des gebildeten Cumarinylmethylkations durch Reaktion mit H_2O .

Überträgt man diese Erkenntnisse über den Photolysemechanismus auf die hier hergestellten **CMOC**-*caged* Verbindungen, ergibt sich wie in Abbildung 3-44 beispielhaft an **CMOC**-*caged* Emetin-Verbindungen gezeigt, dass die Photolyse in wässrigen Medien nach der heterolytischen Bindungsspaltung zu einem Cumarinylmethylkation und einem Carbamatanion führt. Das Cumarinylmethylkation stabilisiert sich anschließend durch die Reaktion mit Wasser aus dem Lösungsmittel zum (Cumarin-4-yl)methylalkohol während das Carbamatanion nach Protonierung unter Bildung von Emetin decarboxyliert. Die Decarboxylierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Emetin-Bildung.

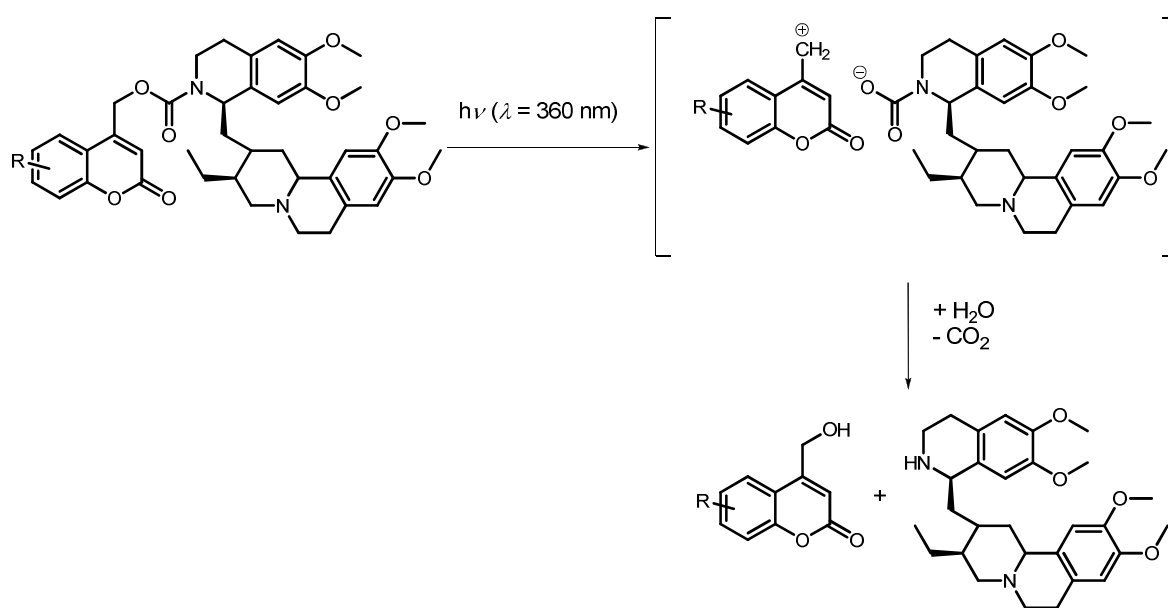


Abbildung 3-44: Angenommener Mechanismus der Photospaltung von **CMOC**-*caged* Emetin.

Die analytischen Untersuchungen zu den in dieser Arbeit synthetisierten (Cumarin-4-yl)methoxy-carbonyl-Verbindungen sowie zeitaufgelöste Fluoreszenz- und IR-Messungen unterstützen den in Abbildung 3-44 dargestellten Mechanismus. Die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wiesen, wie nach dem aufgeführten Mechanismus zu erwarten, eine sehr schnelle Bildung der (Cumarin-4-yl)methylalkohole nach und durch die zeitaufgelösten IR-Messungen wurde die sich an die heterolytische Bindungsspaltung anschließende deutlich langsamere Bildung von CO_2 sichtbar gemacht.

Der Mechanismus der Photospaltung von **NB**- und **NPE**-Verbindungen wurde wie in der Einleitung beschrieben, sehr gut photophysikalisch untersucht und bewiesen.²¹ Daher wird davon ausgegangen, dass der in Abbildung 1-4 beschriebene Photolysemechanismus auch für die Photospaltung von **DMNPE**-caged CCCP, die zu freiem CCCP führt, gilt (vgl. Abbildung 3-45).

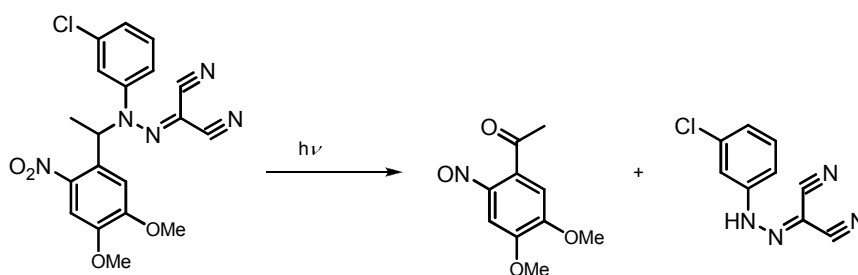


Abbildung 3-45: Angenommener Mechanismus der Photolyse von **BDMNPE**-caged CCCP.

Der in Abbildung 3-46 aufgeführte Mechanismus zur Photospaltung des **BBCMNP-ED**-caged Bourgeonals ist von dem im Kapitel 1.3.2 vorgestellten Mechanismus und einer entsprechenden Modifizierung von KANTEVARI *et al.* abgeleitet.^{18b,26a} Er wurde in dieser Arbeit allerdings nicht näher untersucht. Selbverständlich wurde aber die Bildung von Bourgeonal nachgewiesen.

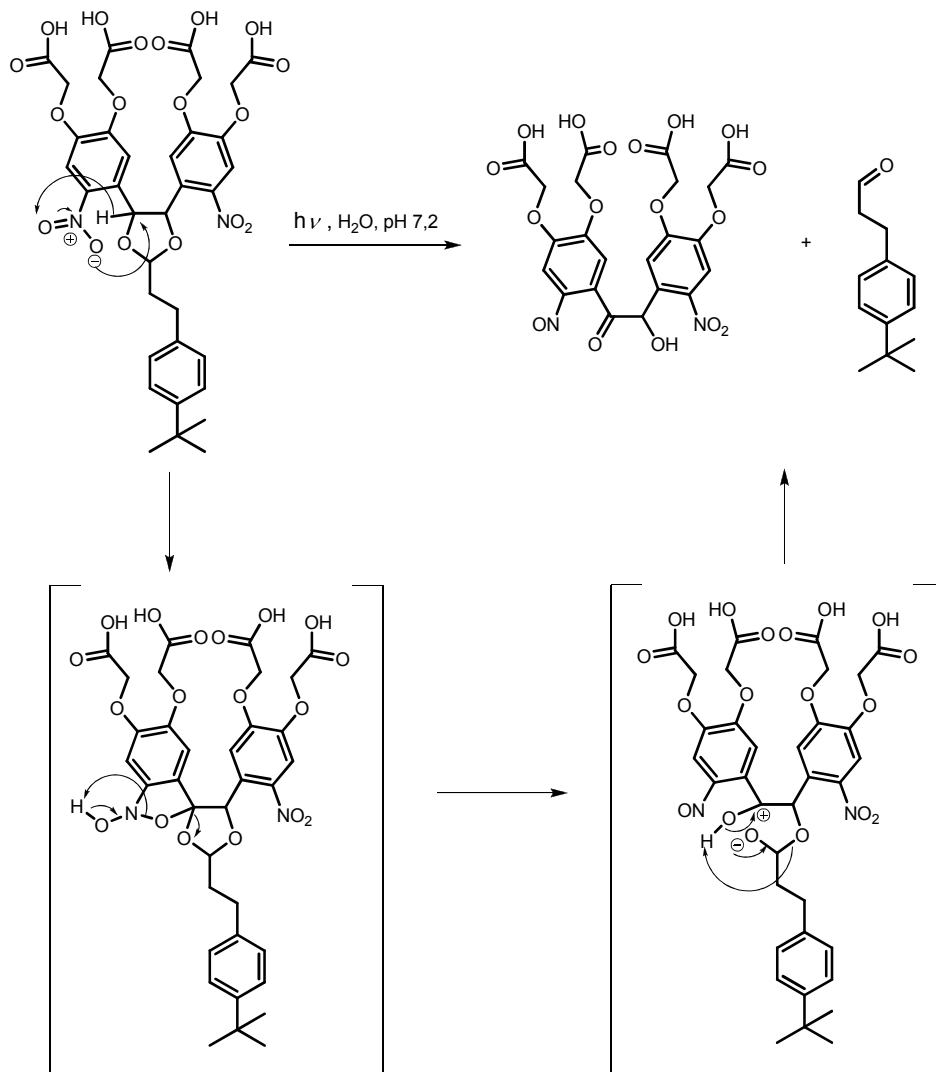


Abbildung 3-46: Angenommener Photolysemechanismus von **BBCMNP-ED-caged Bourgeonal**.^{18b}

Photochemische Quantenausbeuten und Photoeffizienzen

Die photochemische Quantenausbeute Φ_{chem} einer Substanz ist ein Maß dafür, mit welchem Wirkungsgrad die eingestrahlten Photonen in dem betreffenden Prozess genutzt werden. Φ_{chem} ist eine Effektivitätsgröße und beschreibt das Verhältnis zwischen absorbierten Photonen und der daraus folgenden Photospaltung. Bei einer photochemischen Reaktion definiert sich Φ_{chem} durch den Quotienten aus der Anzahl umgesetzter Moleküle (verschwindende Moleküle N_1 bzw. entstehende Moleküle N_2) und der Anzahl der absorbierten Lichtquanten N_{abs} (Gleichung 1).¹²¹

$$\Phi_1 = \Phi_2 = -\frac{N_1}{N_{\text{abs}}} = \frac{N_2}{N_{\text{abs}}} \quad \text{Gleichung 1}$$

In der vorliegenden Arbeit wurden die bestimmten photochemischen Quantenausbeuten Φ_{chem} aller Verbindungen nach der auf Gleichung 2 basierenden Relativmethode bestimmt (experimentelle Details sind in Kapitel 5.3.2 angegeben). Bei dieser Methode wird der Initialanstieg dc/dt der Probe mit dem eines Standards, dessen photochemische Quantenausbeute bekannt ist, verglichen.

$$\Phi_{\text{chem}}^{\text{Probe}} = \Phi_{\text{chem}}^{\text{Standard}} \cdot \frac{\left[\frac{\partial c}{\partial t} \right]^{\text{Probe}}}{\left[\frac{\partial c}{\partial t} \right]^{\text{Standard}}} \cdot \frac{I_{\text{abs}}^{\text{Standard}} V_{\text{R}}^{\text{Standard}}}{I_{\text{abs}}^{\text{Probe}} V_{\text{R}}^{\text{Probe}}} \quad \text{Gleichung 2}$$

Werden Standard und Probe unter identischen Absorptions- und Anregungsbedingungen, d.h. λ_{exc} und I_0 sind gleich, bestrahlt, kann Gleichung 2 durch Einsetzen von Gleichung 3 zu Gleichung 4 vereinfacht werden. Die pro Zeiteinheit absorbierte Lichtmenge I_{abs} wurde mit Gleichung 3 berechnet. Der in dieser Gleichung enthaltene Wert für E steht für die Extinktion der Reaktionslösung bei $\lambda = 360 \text{ nm}$ und konnte aus dem UV/Vis-Spektrum entnommen werden.

$$I_{\text{abs}} = (1 - 10^{-E}) I_0 \quad \text{Gleichung 3}$$

$$\Phi_{\text{chem}}^{\text{Probe}} = \Phi_{\text{chem}}^{\text{Standard}} \cdot \frac{\left[\frac{\partial c}{\partial t} \right]^{\text{Probe}}}{\left[\frac{\partial c}{\partial t} \right]^{\text{Standard}}} \cdot \frac{(1 - 10^{-E})^{\text{Standard}}}{(1 - 10^{-E})^{\text{Probe}}} \quad \text{Gleichung 4}$$

Die in der Gleichung enthaltenen Werte für die zeitliche Konzentrationsabnahme von Probe und Standard wurde über den Abbau der HPLC-Peakflächen bei der Bestrahlung als Anstieg der linearen Regressionsgeraden ermittelt.

Um interne Filtereffekte durch neugebildete Photoprodukte zu vermeiden, wurden die Quantenausbeuten innerhalb der ersten 10 % des photolytischen Abbaus der *caged* Verbindung gemessen.

Nicht nur die gefundene photochemische Quantenausbeute, sondern auch die Absorptivität einer *caged* Verbindung ist für eine effiziente Photolyse und damit für die erfolgreiche Nutzung der eingestrahlten Photonen wichtig. Das Produkt aus dem Extinktionskoeffizienten bei einer bestimmten Wellenlänge und dem Φ_{chem} -Wert ist ein Maß für die Effizienz oder Empfindlichkeit der Photospaltung.^{38,122}

In Tabelle 3-7 sind die ermittelten Φ_{chem} -Werte und die Photoeffizienzen der (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl-*caged* Verbindungen der Biomoleküle **1-5** bei der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 360 nm aufgeführt. Wie die Tabelle zeigt, haben die **BCMCMOC**-geschützten Verbindungen im Vergleich zu den **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-geschützten Analoga deutlich geringere Φ_{chem} -Werte, was trotz ihrer in Kapitel 3.2.2 gezeigten hohen Extinktionskoeffizienten nur zu einer moderaten Photoeffizienz führt. Höhere Φ_{chem} -Werte wurden bei den **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-geschützten Biomolekülen ermittelt. Sie lagen bis auf eine Ausnahme (Verbindung **107**) im Bereich von $0,10 \leq \Phi_{\text{chem}} \leq 0,21$, was in Zusammenhang mit den guten Extinktionskoeffizienten zu den recht hohen Photoeffizienzen von 1300 bis 3100 l mol⁻¹ cm⁻¹ führt. Vergleicht man die **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-*caged* Verbindungen ein und desselben Biomoleküls hinsichtlich ihrer photochemischen Eigenschaften finden sich nur geringe Unterschiede. Die λ_{max} -, ϵ_{max} -, Φ_{chem} -Werte und die Photoeffizienzen sind nahezu identisch. Einzig die Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen ist bei den **BBHCMOC**-*caged* Verbindungen deutlich höher. Somit erwies sich die **BBHCMOC**-Schutzgruppe für Amino- und Hydroxyverbindungen als eine verbesserte Version der **BHCMOC**-Schutzgruppe.

Der Vergleich zwischen den an unterschiedlichen Funktionen des Octopamins geschützten **BHCMOC**-Verbindungen **72**, **89** und **97** hinsichtlich ihrer Photoeffizienz zeigt drei hervorragend geeignete *caged* Verbindungen die sich in ihren photochemischen Eigenschaften nur minimal unterscheiden. Hier müssen die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich ihrer biologischen Eigenaktivität über ihren Wert als Werkzeug für die angedachten biologischen Fragestellungen entscheiden.

Tabelle 3-7: Photochemische Quantenausbeuten (Φ_{chem}), Photoeffizienzen und Wiederfindungsraten der Biomoleküle nach Bestrahlung der *caged* Verbindungen mit Licht ($\lambda = 360$ nm) in MeCN/Phosphatpuffer (5/95), pH = 7,2.

| Nr. | Verbindung | Φ_{chem} | $\epsilon_{360} \times \Phi_{\text{chem}}$ [l mol ⁻¹ cm ⁻¹] | Wiederfindungsrate [%] |
|-----|---|----------------------|---|---------------------------|
| 70 | BCMACMOC-caged Dopamin | 0,005 | 79 | 99 |
| 73 | BHCMOC-caged Dopamin | 0,10 | 1740 | 93 |
| 79 | BBHCMOC-caged Dopamin | 0,12 | 2160 | 95 |
| 69 | BCMACMOC-caged Octopamin | 0,008 | 150 | 87 |
| 72 | BHCMOC-caged Octopamin | 0,16 | 2744 | 100 |
| 78 | BBHCMOC-caged Octopamin | 0,11 | 1650 | 100 |
| 89 | <i>O</i> ¹ - BHCMOC-caged Octopamin | 0,21 | 2342 | 100 |
| 97 | <i>O</i> ² - BHCMOC-caged Octopamin | 0,18 | 3105 | 100 |
| 81 | PBHCMOC-caged Octopamin | 0,13 | 1519 | 88 |
| 82 | DBHCMOC-caged Octopamin | 0,13 | 1813 | 100 |
| 104 | BCMACMOC-caged Emetin | 0,005 | 98 | 98 |
| 105 | BHCMOC-caged Emetin | 0,13 | 1690 | 94 |
| 107 | BBHCMOC-caged Emetin | 0,085 | 1335 | 99 |
| 99 | BCMACMOC-caged Epinastin | 0,008 | 130 | 88 |
| 100 | BHCMOC-caged Epinastin | 0,14 | 2128 | 85 |
| 102 | BBHCMOC-caged Epinastin | 0,19 | 2527 | 77 |
| 108 | BHCMOC-caged Anisomycin | 0,13 | 2457 | 100 |
| 110 | BBHCMOC-caged Anisomycin | 0,11 | 1716 | 82 |
| 68 | BCMACMOC-caged Phenylethylamin | 0,01 | 194 | n.b. |
| 71 | BHCMOC-caged Phenylethylamin | 0,16 | 2672 | n.b. |
| 77 | BBHCMOC-caged Phenylethylamin | 0,15 | 2550 | n.b. |
| 111 | DMNPE-caged CCCP** | 0,04 | 744 | 58 |
| 112 | DMCM-caged CCCP** | 0,000 | 0 | 0 |
| 113 | BDMNP-ED-caged Bourgeonal* | 0,11 | 996 | 75 |
| 115 | BBCMNP-ED-caged Bourgeonal* | 0,05 | 410 | 60 |

*in MeCN/HEPES (5/95), pH = 7,2, **in MeCN/H₂O (1/1), $\lambda = 334$ nm; n.b. nicht bestimmt

Wichtig für den Wert von *caged* Verbindungen sind auch die Wiederfindungsraten der Biomoleküle nach vollständiger Photolyse. Um diese in Tabelle 3-7 gezeigten Parameter zu ermitteln, wurden die Lösungen der *caged* Verbindungen in MeCN/Phosphatpuffer (5/95) bei 360 nm so lange bestrahlt, bis das Edukt komplett abgebaut war. Danach wurde durch HPLC-Vergleichsmessungen ermittelt, wieviel von dem Biomolekül in der Lösung freigesetzt wurde. Mit einer gefundenen durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 94 % und in einigen Fällen sogar 100 % ist die Photofreisetzung der Biomoleküle **1-5** aus (Cumarin-4yl)methoxycarbonyl-geschützten Verbindungen generell nahezu quantitativ.

Die bis zum Ende der vorliegenden Arbeit einzigen bekannten *caged* Bourgeonal-Verbindungen sind die im Kapitel 1.5.4 vorgestellten **CM-ED-*caged*** Bourgeonale (vgl. Abbildung 1-16).¹⁰⁴ Diese weisen im Verhältnis zu den hier synthetisierten Bourgeonal-Derivaten **111** und **113** deutlich höhere Extinktionskoeffizienten und bathochrom verschobene langwelligste Absorptionsmaxima auf. Allerdings sind die photochemischen Quantenausbeuten bei den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Derivate sehr viel besser als die von **BCMACM-ED-*caged*** Bourgeonal, besser als die von **BHC-ED-*caged*** Bourgeonal und genauso gut wie die von **BBHC-ED-*caged*** Bourgeonal.

Die in Tabelle 3-7 angegebenen Wiederfindungsraten von Bourgeonal sind mit 60 bzw. 75 % für Carbonylverbindungen sehr hoch und deutlich besser als die Wiederfindungsraten bei den **CM-ED-*caged*** Bourgeonal-Verbindungen, für die Werte von maximal 46 % gefunden wurden.¹⁰⁴ Insgesamt wird eingeschätzt, dass **BBCMNP-ED-*caged*** Bourgeonal und auch **BBHCM-ED-*caged*** Bourgeonal gute Phototrigger für Bourgeonal sind.

In Tabelle 3-7 sind auch die photochemischen Eigenschaften der synthetisierten *caged* CCCP-Derivate aufgeführt. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, fand bei der photochemischen Anregung von **DMCM-*caged*** CCCP (**112**) bei $\lambda = 334$ nm oder $\lambda = 360$ nm in MeCN/H₂O (1/1) keine Photolyse statt. Für **DMNPE-*caged*** CCCP (**111**) konnte bei der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 334$ nm in MeCN/H₂O (1/1) eine moderate photochemische Quantenausbeute gefunden werden. Die Verbindung ist der erste bekannte *caged* Ionophor und durch eine ausreichende Absorption und photochemische Quantenausbeute mit einer Photoeffizienz von $670 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ durchaus als *caged* Verbindung geeignet.

3.2.4 Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung

Bei der Bestrahlung der *caged* Verbindungen mit Licht (elektromagnetische Strahlung) werden Elektronen der Moleküle vom elektronischen Grundzustand S_0 auf den ersten angeregten Zustand S_1 angehoben. In diesem S_1 -Zustand findet die photolytische Spaltung statt. Anhand der Quantenausbeuten der Photolyse der *caged* Verbindungen ist zu sehen, dass nur maximal 20 % des eingestrahlten Lichts zur Photoreaktion führen. Daneben finden verschiedene strahlungslose Desaktivierungsprozesse, z.B. innere Umwandlung (IC, *internal conversion*) und *intersystem crossing* (ISC) statt, die zur Rückkehr der Elektronen in den S_0 bzw. beim ISC zum Übergang der Elektronen in den Triplett-Zustand T_1 führen. Ein wichtiger Konkurrenzprozess zur Photolyse ist die Emission von Photonen bei der Rückkehr der Elektronen vom S_1 - zum S_0 -Zustand. Die Lumineszenz der emittierten Photonen wird als Fluoreszenz bezeichnet. Cumarine sind für ihre hohen Fluoreszenzintensitäten bekannt. Diese Eigenschaft wird auf die Starrheit dieser Chromophore zurückgeführt, welche die strahlungslosen Desaktivierungsprozesse erschwert.¹²³ Die Einführung von Elektronendonator- bzw. Elektronenakzeptor-Substituenten in konjugationsfähige Positionen am Cumaringerüst (vgl. Abbildung 3-39) führt durch intramolekulare Ladungsübertragung (ICT, *intramolecular charge transfer*) zu einer Erhöhung der Fluoreszenz.^{31,36a}

Hier werden die nach der in Kapitel 5.3.3 beschriebenen Methode ermittelten Fluoreszenzquantenausbeuten (Φ_{fl}) für die in dieser Arbeit entwickelten durch **CM**-Schutzgruppen maskierten Biomoleküle vorgestellt. Der Φ_{fl} -Wert ist eine Maßzahl zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität des Moleküls und ist definiert als der Quotienten aus der Anzahl der emittierten Photonen und der Anzahl der absorbierten Photonen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Φ_{fl} -Werte relativ zu dem literaturbekannten Standard Chininsulfat in 1N H_2SO_4 ($\Phi_{fl} = 0,546$) nach Gleichung 5 bestimmt.¹²⁴

Der letzte Term in Gleichung 5 entfällt, wenn die Proben- und die Standardlösung bei der Messung die gleiche Absorption bei der eingesetzten Einstrahlungswellenlänge aufweisen und damit

$I_{abs,Standard} = I_{abs}$ ist. Der Einsatz unterschiedlicher Lösungsmittel findet im Term $\left(\frac{n}{n_{Standard}}\right)^2$ seine

Beachtung. Setzt man die Flächen der gegen die Energie aufgetragenen Emissionsspektren der Probe und des Standards ins Verhältnis, erhält man mit Gleichung 5 den Φ_{fl} -Wert der Probe.

$$\Phi_{fl} = \Phi_{fl,Standard} \cdot \frac{\int I_{fl}(\tilde{\nu})d\tilde{\nu}}{\int I_{fl,Standard}(\tilde{\nu})d\tilde{\nu}} \cdot \left(\frac{n}{n_{Standard}}\right)^2 \cdot \frac{I_{abs,Standard}}{I_{abs}} \quad \text{Gleichung 5}$$

mit $\tilde{\nu}$ = Wellenzahl, I_{fl} = Fluoreszenzintensität, n = Brechungsindex, I_{abs} = Quantenstrom

Tabelle 3-8: Fluoreszenzmaxima (λ_{fl}), Fluoreszenzquantenausbeuten (Φ_{fl}) und Stokes-Verschiebungen der **CM**-OH und der **CM-caged** Verbindungen in MeCN/Phosphatpuffer (5/95), pH = 7,2.

| Nr. | Verbindung | λ_{fl} [nm] | Φ_{fl} | Stokes-Shifts [nm] |
|-----|---|------------------------|-------------|-----------------------|
| 13 | BCMACM -OH | 491 | 0,19 | 117 |
| 16 | BHCM -OH | 470 | 0,60 | 103 |
| 19 | DBHCM -OH | 465 | 0,60 | 98 |
| 23 | BBHCM -OH | 463 | 0,57 | 94 |
| 25 | PBHCM -OH | 465 | 0,32 | 99 |
| 69 | BCMACMOC-caged Octopamin | 497 | 0,12 | 117 |
| 72 | BHCMOC-caged Octopamin | 476 | 0,29 | 104 |
| 78 | BBHCMOC-caged Octopamin | 470 | 0,23 | 98 |
| 81 | PBHCMOC-caged Octopamin | 471 | 0,15 | 96 |
| 82 | DBHCMOC-caged Octopamin | 470 | 0,26 | 99 |
| 89 | <i>O</i> ¹ - BHCMOC-caged Octopamin | 473 | 0,06 | 99 |
| 70 | BCMACMOC-caged Dopamin | 498 | 0,05 | 118 |
| 73 | BHCMOC-caged Dopamin | 471 | 0,11 | 99 |
| 79 | BBHCMOC-caged Dopamin | 470 | 0,12 | 98 |
| 104 | BCMACMOC-caged Emetin | 495 | 0,05 | 118 |
| 105 | BHCMOC-caged Emetin | 472 | 0,18 | 93 |
| 107 | BBHCMOC-caged Emetin | 465 | 0,11 | 85 |
| 99 | BCMACMOC-caged Epinastin | 493 | 0,03 | 110 |
| 100 | BHCMOC-caged Epinastin | 472 | 0,13 | 98 |
| 102 | BBHCMOC-caged Epinastin | 465 | 0,05 | 90 |
| 108 | BHCMOC-caged Anisomycin | 475 | 0,18 | 99 |
| 110 | BBHCMOC-caged Anisomycin | 470 | 0,17 | 96 |
| 68 | BCMACMOC-caged Phenylethylamin | 498 | 0,12 | 118 |
| 71 | BHCMOC-caged Phenylethylamin | 475 | 0,30 | 103 |
| 77 | BBHCMOC-caged Phenylethylamin | 466 | 0,28 | 94 |

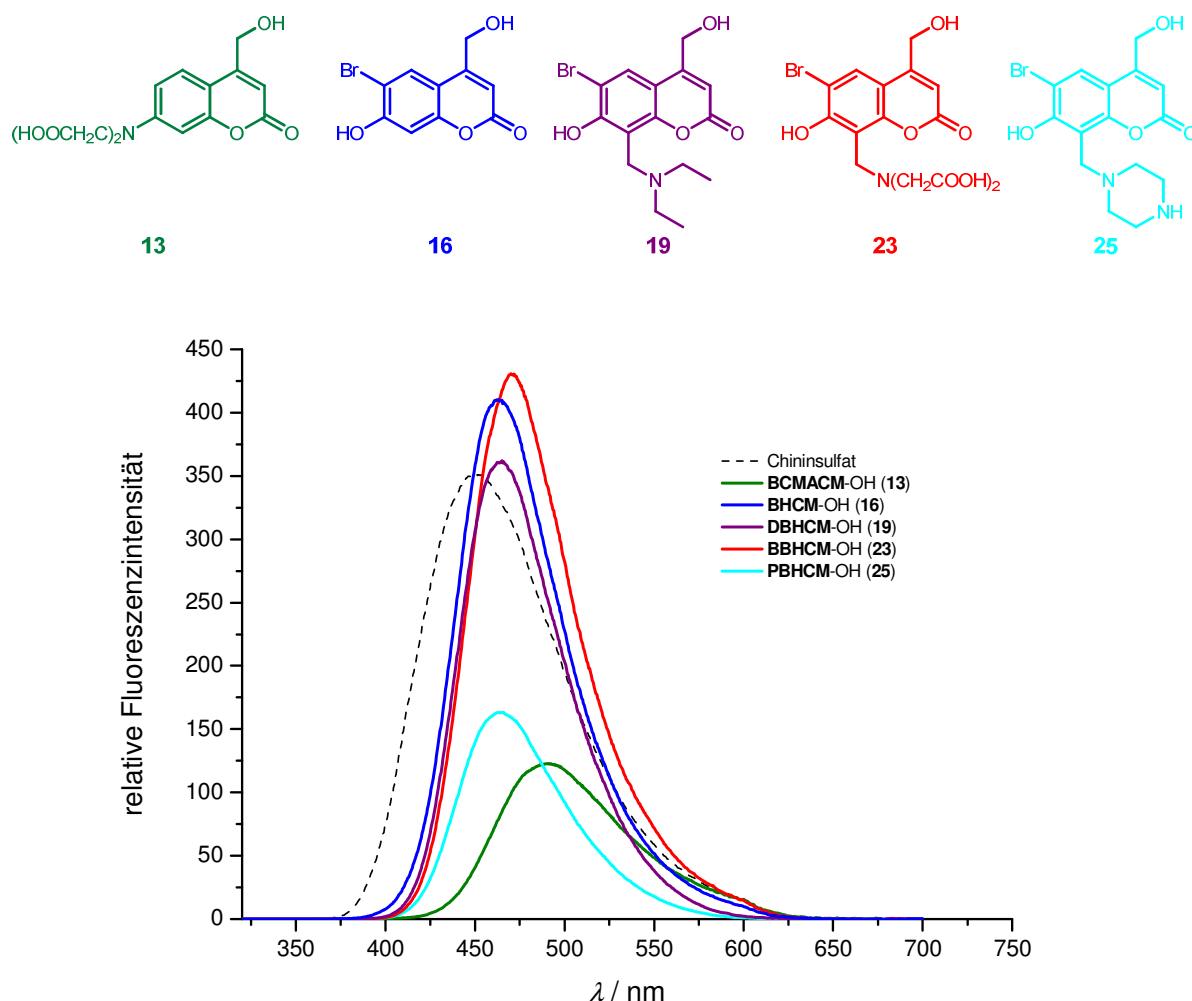


Abbildung 3-47: Normierte Fluoreszenzspektren der bei der Photolyse entstehenden **CM**-OHs.

In Tabelle 3-8 sind die Fluoreszenzmaxima (λ_{fl})- und die Φ_{fl} -Werte der in dieser Arbeit untersuchten 4-(Hydroxymethyl)cumarine aufgeführt und in Abbildung 3-47 werden ihre Fluoreszenzspektren gezeigt. Die **CM**-Alkohole **16**, **19**, **23** und **25** weisen Fluoreszenzmaxima im Bereich von 463 bis 470 nm auf. Bei der Verbindung **BCMACM**-OH (**13**) ist der λ_{fl} -Wert bathochrom auf 491 nm verschoben. Die Φ_{fl} -Werte der Verbindungen **16**, **23** und **25** sind mit 0,60 sehr hoch. Der Φ_{fl} -Wert von **DBHCM**-OH beträgt nur 0,32 und der Φ_{fl} -Wert von **BCMACM**-OH sogar nur 0,19. Die mögliche Ursache für die Absenkung des Φ_{fl} -Wertes von **13** könnte darin liegen, dass bei unverbrückten 7-(Dialkylamino)cumarinen ein IC-Übergang von einem fluoreszierenden ICT-Übergang in einen strahlungslosen verdrillten intramolekularen Ladungsübertragungszustand (TICT, *twisted intramolecular charge transfer*) vorkommen kann.^{124b,125} Die Bildung des TICT-Zustands wird in polaren Lösungsmitteln, wie z.B. den verwendeten Pufferlösungen begünstigt.

Die λ_{fl} -Werte der *caged* Verbindungen entsprechen denen der dazugehörigen **CM**-Alkohole. In Abbildung 3-48 sind die Fluoreszenzspektren der verschiedenen *caged* Octopamin-Derivate exemplarisch aufgeführt. Aus dieser Abbildung sowie den in Tabelle 3-8 aufgeführten Φ_{fl} -Werten sieht man, dass die *caged* Derivate geringere Fluoreszenzquantenausbeuten als die entsprechenden **CM**-OHs aufweisen. Optimal für eine *caged* Verbindung wäre keine oder nur sehr geringe Fluoreszenz.

Diese Anforderung erfüllt das O^1 -**BHCMOC**-*caged* Octopamin am besten von den im Rahmen dieser Arbeit getesteten *caged* Octopamin-Verbindungen.

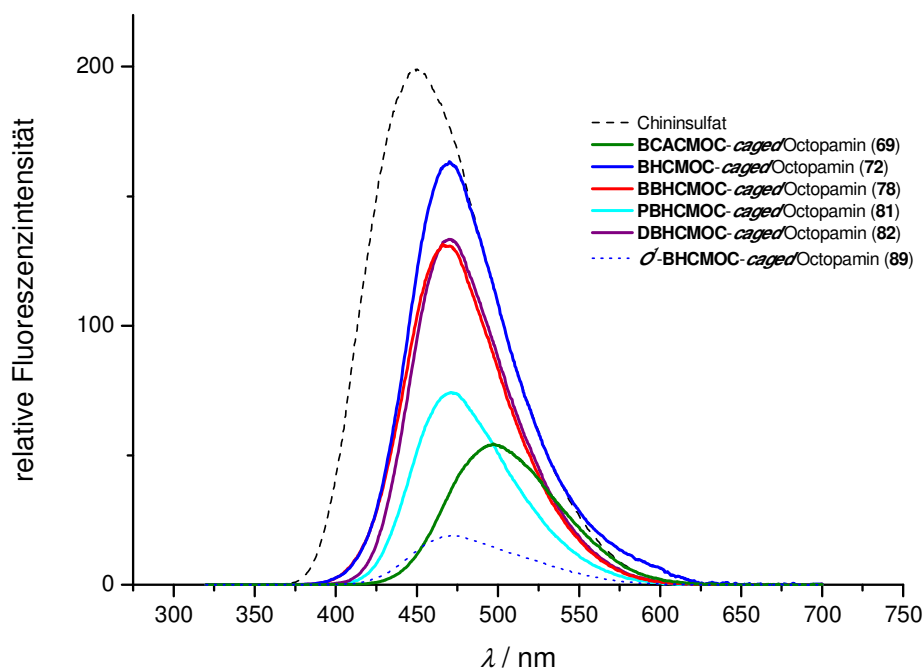


Abbildung 3-48: Normierte Fluoreszenzspektren von **CM**-*caged* Octopamin-Verbindungen.

In Analogie zu den Octopamin-Verbindungen konnte bei den Fluoreszenzmessungen der *caged* Neurotransmitter und der *caged* PSIs festgestellt werden, dass die *caged* Verbindungen ähnliche Fluoreszenzmaxima aufweisen und deutlich schlechter fluoreszieren als die dazugehörigen **CM**-Alkohole.

Die Differenz zwischen dem Maximum der Fluoreszenzemission und dem langwelligsten Absorptionsmaximum eines Chromophors bezeichnet man als Stokes-Shift. Die **BCMACM**-Derivate weisen Stokes-Shifts von über 110 nm und alle anderen Verbindungen Stokes-Shifts von etwa 100 nm auf. Somit überlappen sich die UV- und die Fluoreszenzkurven relativ gering. Die Stokes-Shifts sind relativ groß, was auf stark unterschiedliche Geometrien der S_0 -Minima und S_1 -Minima hinweist.¹²³

3.2.5 pH-Abhängigkeit

Die photochemischen Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten 6-Brom-7-hydroxy-(cumarin-4yl)methyl-geschützten Verbindungen sind pH-abhängig. Setzt man z.B. die **BHCMOC**-Derivate bei pH-Werten >7 ein, liegt die Hydroxygruppe in der 7-Position des Cumarin-Chromophors als Phenolat-Anion vor, welches das bei der Photolyse entstehende (Cumarin-4-yl)methyl-Kation stabilisieren kann und so zu einer Erhöhung der Φ_{chem} -Werte führt. Liegen die **BHCMOC**-Verbindungen als Phenolat-Anionen vor, sind sie weiterhin zur Ausbildung des ICT-Zustandes (siehe Kapitel 3.2.2) befähigt, was bathochrome und hyperchrome Verschiebungen der Absorptionsbanden im Vergleich zur protonierten Form zur Folge hat. Somit verändern sich die Quantenausbeuten und Absorptionseigenschaften der **BHCMOC**-Verbindungen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

2009 ermittelte N. KOTZUR^{5c} die pK_s -Werte unterschiedlich substituierter **BHCM**-Derivate, um den Einfluß zusätzlicher Substituenten am Cumaringerüst näher zu bestimmen. Dies erfolgte mittels Messung der Absorptionsspektren bei verschiedenen pH-Werten in H₂O, MeCN/H₂O (5/95) und MeCN/H₂O (1/1). Die Ergebnisse für **BHCM**-OH und **BBHCM**-OH werden in Tabelle 3-9 aufgezeigt.

Tabelle 3-9: pK_s -Werte einiger (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate.^{5c}

| Verbindung | pK_s^a | pK_s^b | pK_s^c |
|---|------------------|-------------|----------|
| BHCM | | | 7,77 |
| BHCM -OH (16) | 6,27 | 6,45 | 7,04 |
| BBHCM -OH (23) | 4,90 / 8,51 | 4,96 / 9,86 | |
| 7-Hydroxy-4-methylcumarin | 7,83 | 9,16 | 9,88 |
| 8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (Calcein Blau) ¹²⁶ | 3,0 / 6,9 / 11,3 | | |

^a in H₂O; ^b in MeCN/H₂O (5/95); ^c in MeCN/H₂O (50/50)

Der pK_s -Wert von **16** ist, wie bereits früher von FURUTA *et al.*¹²² beschrieben, mit 6,27 im Vergleich zu dem von 7-Hydroxy-4-methylcumarin ($pK_s = 7,83$) um 1,6 Einheiten niedriger. Dieser Effekt beruht auf den elektronenziehenden Eigenschaften des in 6-Position von **16** befindlichen Br-Atoms, welche die Bildung des Phenolat-Anions begünstigt. Mit diesem pK_s -Wert liegen bei pH = 6 allerdings nur noch 50 % von **BHCM**-OH als Phenolat-Anion vor.

Ebenso wie N. KOTZUR berichteten auch ADAMCZYK *et al.* von einer Absenkung des pK_s -Wertes der phenolischen Hydroxygruppe um 1,2 bzw. 1,3 Einheiten durch Einführung eines Aminomethylsubstituenten in der 8-Position.^{5c,105} Der Grund hierfür liegt darin, dass die benachbarte tertiäre Aminogruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zur phenolischen Hydroxyfunktion ausbilden kann. Wie in Tabelle 3-9 gezeigt, sinkt der pK_s -Wert von **BHCM**-OH durch Einführung des Bis(carboxymethyl)aminomethyl-Substituenten in der 8-Position um 1,3 Einheiten. Demzufolge liegen bei pH = 6 noch 90 % des **BBHCM**-OH (**23**) in der Phenolat-Form vor, was eine unverändert effektive

Photospaltung und hohe Absorption bei 360 nm zur Folge hat. In Analogie hierzu sollten bei pH = 6 auch die Verbindungen **PBHCM**-OH und **DBHCM**-OH weitgehend in der Phenolat-Form vorliegen.

Die pK_s -Werte der phenolischen OH-Gruppe in den **CM-caged** Verbindungen sollten denen der jeweiligen **CM**-OHs entsprechen, was bei **BBHCMOC**-, **PBHCMOC**- und **DBHCMOC-caged** Verbindungen eine effiziente Photospaltung auch bei pH-Werten bis zu 6 erlaubt. Damit ergibt sich neben der erhöhten Löslichkeit eine weitere vorteilhafte Eigenschaft für die neu entwickelten **BBHCM**-, **PBHCM**- und **DBHCM-caged** Verbindungen im Vergleich zu entsprechenden BHCMOC-Derivaten.

3.2.6 2-Photonen-Photolyse

Um zu zeigen, dass die neu entwickelten **CM**-geschützten Verbindungen auch durch 2-Photonen-Photolyse freigesetzt werden können, wurde die 2-Photonen-Anregbarkeit von den Modellverbindungen **BBHCMOC-caged** Octopamin (**78**), **BBHCMOC-caged** Emetin (**107**), **PBHCMOC-caged** Octopamin (**81**), **DBHCMOC-caged** Octopamin (**82**) und *O*¹-**BHCMOC-caged** Octopamin (**89**) bestimmt. Wie bereits in der Einleitung betont wurde, ist die 2-Photonen-Anregbarkeit ein wichtiges Kriterium für den Einsatz der *caged* Verbindungen.^{9b} 2-Photonen-Anregung bedeutet, dass die Photolyse nicht durch die Absorption eines UV-Photons sondern durch die gleichzeitige Absorption zweier IR-Photonen ausgelöst wird. Der Einsatz von IR-Strahlung anstelle von UV-Strahlung führt zu einer höheren Eindringtiefe ins Gewebe und einer lokal stärker begrenzten Freisetzung des Biomoleküls, da IR-Strahlung stärker fokussiert werden kann.^{9c} Unter anderem sind schon die 2-Photonen-Quantenausbeuten von **BHCMOC-caged** Glutamat,³⁴ **BHCM-caged** cAMP¹²² und **BHCMOC-caged** Anisomycin⁸⁸ (**108**) bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die 2-Photonen-Quantenausbeute (σ_u) von **78**, **107** und **82**, relativ zu der von Verbindung **108** ($\sigma_u = 0,59$ GM), ermittelt. In Zusammenarbeit mit B. WIESNER (FMP Berlin) wurden die Substanzen **78**, **107**, **82** und **108** in MeCN/Phosphatpuffer (1/1) je 10, 20, 30 und 40 min mit einem Titan-Saphir-Laser bei $\lambda = 755$ nm bestrahlt. Die bestrahlten Proben wurden dann mittels HPLC vermessen. Das **BBHCMOC-**, *O*¹-**BHCMOC-** und **DBHCMOC-caged** Octopamin wurde in etwa der gleichen Geschwindigkeit photolysiert wie **108**. Das **BBHCMOC-caged** Emetin und das **PBHCMOC-caged** Octopamin wurden etwa 2,3 mal schneller photolysiert als Verbindung **108**. Damit ergibt sich näherungsweise eine 2-Photonen-Quantenausbeute für **78** von $\sigma_u = 0,5$ GM, für **81** von $\sigma_u = 1,4$ GM, für **82** von $\sigma_u = 0,7$ GM, für **89** von $\sigma_u = 0,8$ GM und für **107** von $\sigma_u = 1,4$ GM, wobei 1 GM = 10^{-50} cm⁴ s Photon⁻¹ entspricht.

Somit wurde erstmalig nachgewiesen, dass eine Verbindung, die mit den neu entwickelten **BBHCMOC-**, **PBHCMOC-** und **DBHCMOC-**Chromophoren geschützt wurde, auch durch eine 2-Photonen-Photolyse mit ausreichender Empfindlichkeit freigesetzt werden kann.

Tabelle 3-10: 2-Photonen-Quantenausbeute (σ_u) von den **BBHCMOC-caged** Verbindungen **78** und **107**, der **PBHCMOC-caged** Verbindung **81**, der **DBHCMOC-caged** Verbindung **82** sowie den **BHCMOC-caged** Verbindungen **89** und **108**.

| Nr | Verbindung | σ_u [GM] |
|------------|---|-----------------|
| 108 | BHCMOC-caged Anisomycin | 0,6 |
| 78 | BBHCMOC-caged Octopamin | 0,5 |
| 81 | PBHCMOC-caged Octopamin | 1,4 |
| 82 | DBHCMOC-caged Octopamin | 0,7 |
| 89 | <i>O</i> ¹ - BHCMOC-caged Octopamin | 0,8 |
| 107 | BBHCMOC-caged Emetin | 1,4 |

3.2.7 Photokinetische Untersuchungen

Um Informationen über die Geschwindigkeiten der Photospaltung der **CMOC-caged** Aminoverbindungen zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit R. SCHMIDT (Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main) zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen und in Zusammenarbeit mit A. BARTH (Universität Stockholm) zeitaufgelöste IR-Messungen durchgeführt. In Abbildung 3-49 sind die einzelnen Schritte der Photospaltung, die letztendlich zu dem freien Biomolekül, **CM-OH** und CO_2 führt, aufgeführt.

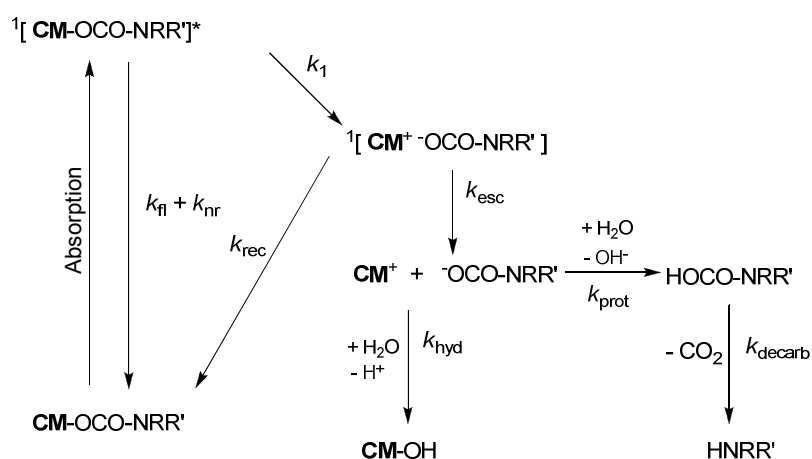


Abbildung 3-49: Mechanismus der Photolyse von **CMOC-caged** Aminoverbindungen.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

Mit der Hilfe von zeitaufgelöster Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie wurden früher schon die Bildungsgeschwindigkeiten der Photolyseprodukte von **CM**-geschützten cyclischen Nucleotiden^{41,50c,127} und Protonen^{35c} ermittelt. Nach der von SCHMIDT *et al.* veröffentlichten Methodik⁴¹ wurden analoge Messungen hier für die Ermittlung der Fluoreszenzlebensdauern (τ_{fl}) und der Geschwindigkeitskonstanten (k_1) für den ersten in Abbildung 3-49 gezeigten Photolyseschritt von einigen in dieser Arbeit entwickelten *caged*-Verbindungen durchgeführt. Bisher waren zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl-*caged* Aminoverbindungen nur für **DMACMOC-caged** Glutamat bekannt.^{41b}

Bei den Laser-induzierten Fluoreszenzmessungen wurden jeweils die **CM**-Alkohole **13**, **16** und **23** sowie die *caged* Verbindungen **70**, **73**, **79**, **104**, **105**, **107** und **110** durch einen Stickstofflaser ($\lambda_{exc} = 337 \text{ nm}$) angeregt. Bei der Einzelimpulsanregung (0,5 ns Impulsbreite) der in Tabelle 3-11 aufgeführten Moleküle wurde die darauffolgende Fluoreszenzabklingkurve detektiert. Aus den so erhaltenen Daten wurden die Fluoreszenzlebensdauern (τ_{fl}) der einzelnen Moleküle ermittelt. Bei den Anregungen der *caged* Verbindungen konnte die Bildung eines ebenfalls fluoreszierenden Photolyseproduktes noch während des Anregungsimpulses beobachtet werden. Da von einem S_N1 -Mechanismus ausgegangen wird und k_{esc} und k_{hyd} sehr groß sind, handelt es sich dabei um den nach der primären Photospaltung aus dem entstehenden Zwitterion gebildeten Alkohol **CM-OH** (siehe Abbildung 3-49). Die Bildungsgeschwindigkeit der **CM-OHs** und damit auch die der Zwitterionen (k_1)

sowie die der Carbamatanionen liegt bei allen untersuchten *caged* Verbindungen im ns-Bereich. Die primäre Photospaltung erfolgt also in allen Fällen sehr schnell. Dies stützt den vorgeschlagenen Photolysemechanismus. Die ermittelten τ_{fl} - und k_1 -Werte sind in Tabelle 3-11 aufgelistet.

Tabelle 3-11: Fluoreszenzlebensdauern (τ_{fl}) und Geschwindigkeitskonstanten k_1 von einigen **CMOC-caged** Aminoverbindungen.

| Nr. | Verbindung | τ_{fl} [ns] | k_1 [s ⁻¹] |
|------------|---------------------------------|------------------|--------------------------|
| 13 | BCMACM-OH | 1,59 | |
| 70 | BCMACMOC-caged Dopamin | 0,85 | $1,5 \cdot 10^9$ |
| 104 | BCMACMOC-caged Emetin | 1,12 | $4,4 \cdot 10^8$ |
| 16 | BHCM-OH | 4,21 | |
| 73 | BHCMOC-caged Dopamin | 1,04 | $1,1 \cdot 10^9$ |
| 105 | BHCMOC-caged Emetin | 1,33 | $5,5 \cdot 10^8$ |
| 23 | BBHCM-OH | 4,72 | |
| 79 | BBHCMOC-caged Dopamin | 1,37 | $7,9 \cdot 10^8$ |
| 107 | BBHCMOC-caged Emetin | 1,52 | $8,9 \cdot 10^8$ |
| 110 | BBHCMOC-caged Anisomycin | 1,74 | $5,0 \cdot 10^8$ |

Zeitaufgelöste IR-Messungen

A. BARTH ist spezialisiert auf zeitaufgelöste IR-Messungen. Mit dieser Methode wurde die Bildungsgeschwindigkeit des bei der Photolyse der (Cumarin-4-yl)methoxycarbonyl-*caged* Aminoverbindungen entstehenden CO₂ gemessen. Die gebildeten CO₂-Moleküle besitzen eine asymmetrische Streckschwingung welche mit IR-Spektroskopie verfolgt werden kann. Bei den Untersuchungen wurde die Bildung der CO₂-Bande zeitaufgelöst bei etwa 2343 cm⁻¹ vermessen. Die Bildungsgeschwindigkeit des CO₂ (k_{decarb}) ist, wie im Photolysemechanismus (Abbildung 3-49) dargestellt, gleichzusetzen mit der Freisetzungsgeschwindigkeit des Biomoleküls und damit ein wichtiger Parameter für die **CMOC-caged** Verbindungen. In Abbildung 3-50 sind die erhaltenen IR-Spektren, die während der Photolyse des **BBHCMOC-caged** Anisomycins (**110**) aufgenommen worden sind, als Beispiel gezeigt. In den übereinandergelegten IR-Spektren ist die kontinuierliche Zunahme der Bande bei circa 2300 cm⁻¹ mit der Bestrahlungszeit zu sehen.

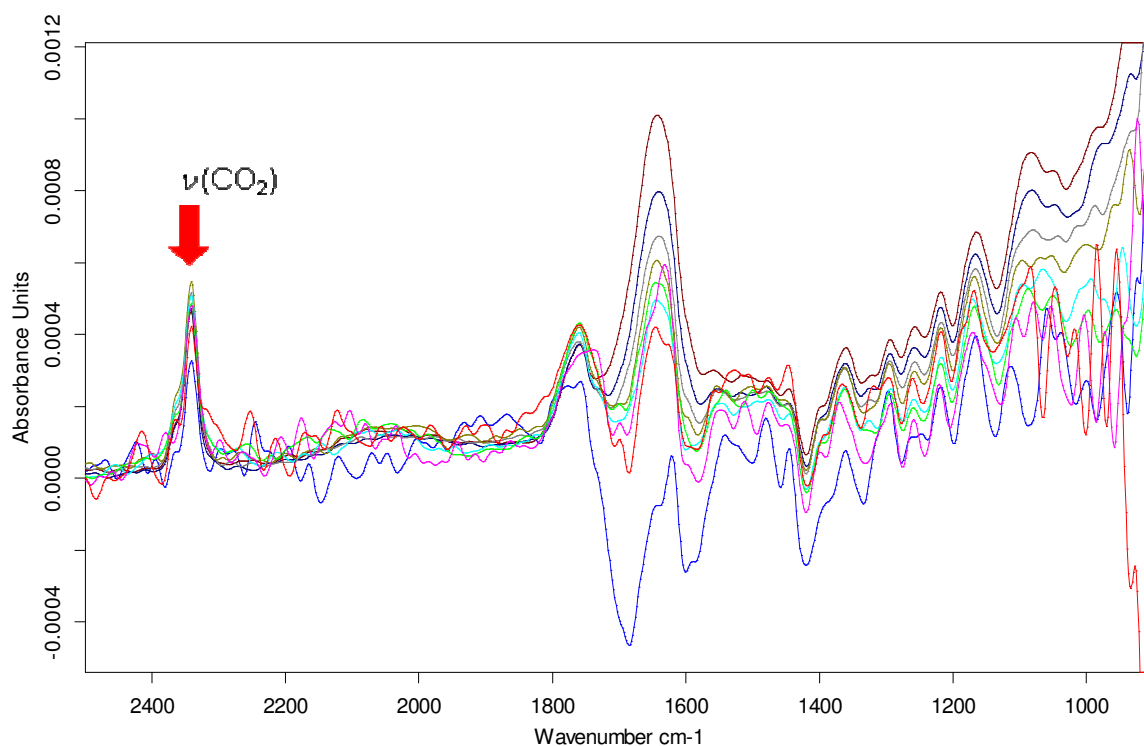


Abbildung 3-50: Zeitaufgelöste IR-Messungen während der Photolyse von **BBHCMOC-caged** Anisomycin (**110**) mit der IR-Bande $\nu(\text{CO}_2) = 2343 \text{ cm}^{-1}$ der asymmetrischen Streckschwingung von dem freigesetzten CO_2 .

Tabelle 3-12: Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung von CO_2 (k_{decarb}) bei der Photolyse der **BBHCMOC-caged** Verbindungen **78**, **107** und **110** bei $\text{pH} = 7,2$ und $1 \text{ }^\circ\text{C}$.

| Nr. | Verbindung | $k_{\text{decarb}} [\text{s}^{-1}]$ |
|------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 78 | BBHCMOC-caged Octopamin | 5 |
| 107 | BBHCMOC-caged Emetin | 1 |
| 110 | BBHCMOC-caged Anisomycin | 18 |

Nach der statistischen Auswertung der gemessenen Daten wurden von A. BARTH die in Tabelle 3-12 aufgeführten Bildungsgeschwindigkeiten für CO_2 (k_{decarb}) bei der Photolyse angegeben.

Die Tabelle zeigt Geschwindigkeitskonstanten zwischen 1 und 18 s^{-1} und da die Decarboxylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Bildung der Biomoleküle ist, muß die Bildung von Octopamin innerhalb von 200 ms , die von Emetin innerhalb von 1 s und die von Anisomycin innerhalb von 56 ms erfolgen.

3.3 Biologische Untersuchungen

In diesem Abschnitt werden erste Ergebnisse der Untersuchungen mit dem *caged* Neurotransmitter Octopamin, mit *caged* Epinastin und den *caged* PSIs vorgestellt. Das **BDMNP-ED-caged** Bourgeonal eignete sich aufgrund der extrem schlechten Löslichkeit nicht für den Einsatz in einem biologischen System. Das verbesserte **BBCMNP-ED-caged** Bourgeonal soll noch von U. B. KAUPP *et al.* (caesar Bonn) an Riechzellen untersucht werden. Das **DMNPE-caged** CCCP wurde vom Arbeitskreis T. JENTSCH (FMP und MDC Berlin) getestet, führte aber wegen der relativ geringen Löslichkeit, die nicht die erforderlichen Konzentrationssprünge des Biomoleküls gestattete, zu keinem Einsatz bei biologischen Fragestellungen.

3.3.1 Anwendungen von *caged* Octopamin und *caged* Epinastin

Wie bereits erwähnt, sollen *caged* Octopamine und *caged* Epinastine helfen, Hirnregionen in der Honigbiene zu identifizieren, die für das Lernverhalten und die Gedächtnisbildung von Bedeutung sind. Ein entsprechendes Projekt wird gegenwärtig von D. EISENHARDT (FU Berlin) bearbeitet. In diesem wurde mit Tests begonnen, welche die Eignung der verschiedenen *caged* Octopamin- und *caged* Epinastin-Derivate in einem Zellmodell evaluieren. Insbesondere galt es auszuschließen, dass die *caged* Verbindungen selbst mit dem Octopamin-Rezeptor wechselwirken. Weiterhin sollte nachgewiesen werden, dass nach Bestrahlung der *caged* Verbindungen räumlich und zeitlich aufgelöst die bereits publizierten pharmakologischen Effekte¹²⁸ der aktiven Biomoleküle gemessen werden können.

Entsprechende Untersuchungen wurden von B. WIESNER (FMP Berlin) in Kooperation mit D. EISENHARDT, A. BAUMANN (FZ Jülich) und uns mittels Laser-Scanning Mikroskopie ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, λ_{det} : Band Pass 493 – 650 nm) durchgeführt. A. BAUMANN stellte hierfür HEK 293 Zellen¹²⁸, die mit dem Octopamin-Rezeptor AmOA1A der Honigbiene stabil transfiziert waren, zur Verfügung.

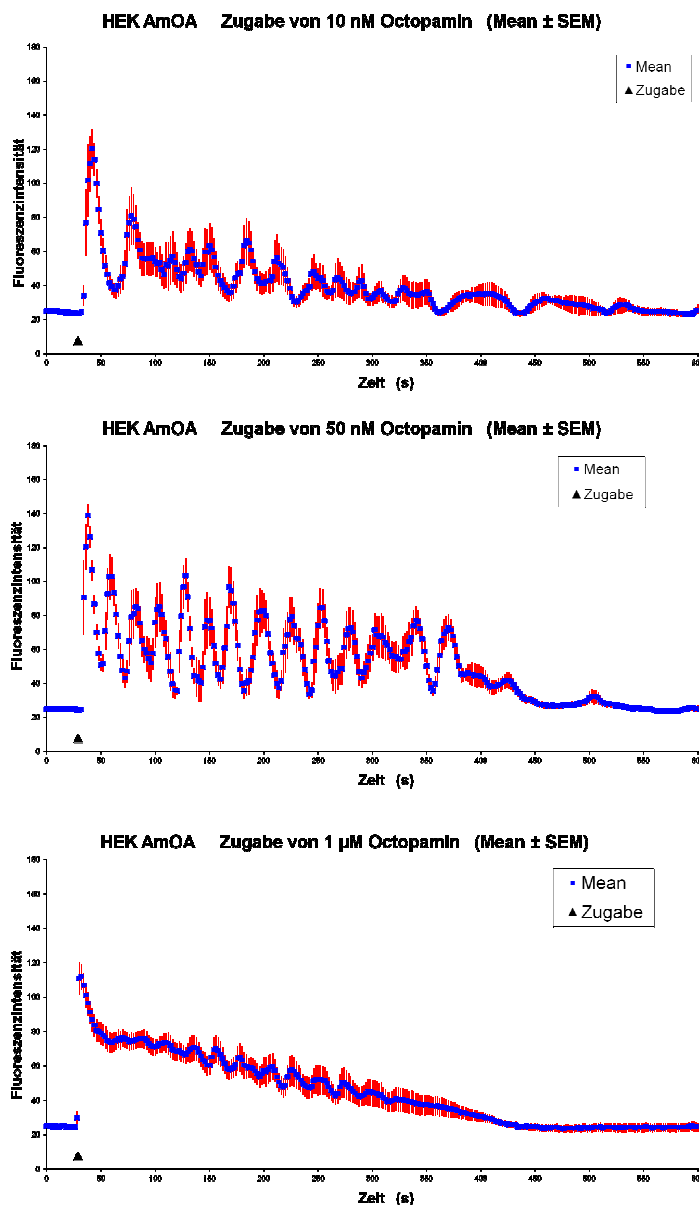


Abbildung 3-51: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen mittels der Fluoreszenz des Ca^{2+} -Indikators FLUO4-AM in HEK 293 AmOA-Zellen bei extrazellulärer Applikation von Octopamin in den Konzentrationen 10 nM, 50 nM und 1 μM . Die abgebildeten Diagramme zeigen die Mittelwerte (*Mean*) \pm Standardfehler (*SEM*) von je 10 vermessenen Zellen.

Die Applikation des Neurotransmitters Octopamin in den Konzentrationen 10 nM, 50 nM und 1 μM zu den HEK 293 AmOA-Zellen führte zu den in Abbildung 3-51 aufgeführten intrazellulären Ca^{2+} -Ausschüttungssignalen. Gemessen wurde die zeitliche Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels der Fluoreszenz des Ca^{2+} -Indikators FLUO4-AM, 2-[[2-(2-{5-[Bis(carboxymethyl)amino]-2-methylphenoxy}ethoxy-4-[(2,7-difluor-6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-phenyl](carboxymethyl)amino}acetoxymethylester, vor und nach der Applikation des Neurotransmitters. Die Untersuchungen bestätigten die bereits publizierte Reaktion¹²⁸ dieser Zellen auf Octopamin.

In nachfolgenden Experimenten wurden die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten (Cumarin-4-yl)methyl-geschützten Octopamin-Verbindungen **72**, **78**, **81**, **82**, **89** und **97** in Konzentrationen von jeweils 1 μM unter den gleichen Bedingungen wie der native Neurotransmitter an HEK 293 AmOA-

Zellen getestet. Die Zugabe aller *caged* Octopamine unter Lichtausschluß zu den Zellen führte zu keinen Änderungen der Ca^{2+} -Signale, d.h. eine biologische Eigenaktivität der Substanzen kann ausgeschlossen werden. Bei Zugabe der *caged* Verbindungen und zusätzlicher Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 405 \text{ nm}$ setzten alle Derivate Octopamin in ausreichenden Mengen und in der gewünschten Geschwindigkeit frei, was durch entsprechende intrazelluläre Ca^{2+} -Wellen dokumentiert werden konnte. Gezeigt wird dies in Abbildung 3-52, in der die Ca^{2+} -Ströme bei Intervallbestrahlung (nach 100 s, 300 s und 500 s) von HEK 293 AmOA-Zellen, welche vorher mit **BHCMOC**- bzw. **BBHCMOC**-*caged* Octopamin in extrazellulären Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ behandelt wurden, dargestellt sind.

Die schnelle Freisetzung des Octopamins (Freisetzung innerhalb von 200 ms, siehe Kapitel 3.2.7) durch Photolyse der *caged* Verbindung kann anhand der sofortigen Ca^{2+} -Antwort unmittelbar abgelesen werden. Das schnellere Abklingen der durch Octopamin initiierten Ca^{2+} -Wellen im Vergleich zur Abbildung 3-51 lässt sich durch die lokale Freisetzung erklären. Die Belichtung bei 405 nm erfolgte im mikroskopischen Bildausschnitt ($500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$). Die Zellen befanden sich auf einem Deckglas ($d = 30 \text{ mm}$), das mit 1 ml Lösung versehen war. Die Freisetzung erfolgte bezogen auf die gesamte Flüssigkeitsmenge also in einem sehr kleinen Volumen. Durch freie Diffusion wurde somit sehr schnell die freigesetzte lokale Octopamin-Konzentration reduziert.

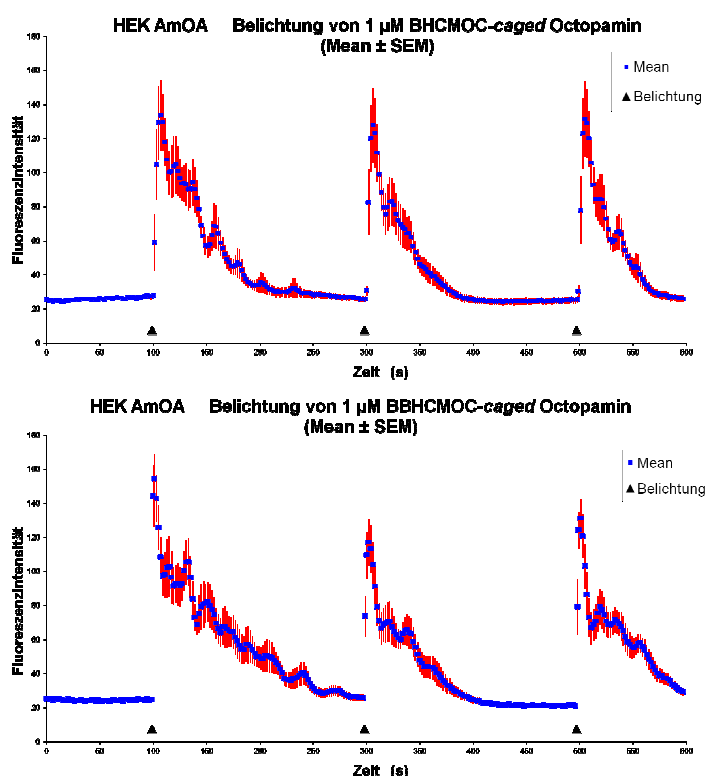


Abbildung 3-52: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen mittels der Fluoreszenz des Ca^{2+} -Indikators FLUO4-AM in HEK 293 AmOA-Zellen bei extrazellulärer Applikation von **BHCMOC(72)**- und **BBHCMOC-caged** Octopamin (**78**) in der extrazellulären Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ und Belichtung nach 100 s, 300 s und 500 s. Die abgebildeten Diagramme zeigen den *Mean*- \pm *SEM*-Wert von je 10 vermessenen Zellen.

Auch mit den Octopamin-Derivaten **81**, **82**, **89** und **97** wurden analoge Ergebnisse erhalten. Somit erfüllen sowohl die an der Aminofunktion (**72**, **78**, **81** und **82**) als auch die an der phenolischen Hydroxyfunktion (**89**) oder an der aliphatischen Hydroxyfunktion (**97**) maskierten *caged* Octopamine in

den Zelltests alle Anforderungen und eignen sich daher als *caged* Verbindungen. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen *N*-, *O*¹- und *O*²-*caged* Octopamin festgestellt werden.

In weiteren Versuchen wurden der Octopamin-Antagonist Epinastin und die *caged* Epinastin-Derivate **100** und **102** an HEK 293 AmOA-Zellen untersucht. In Abbildung 3-53 werden die erhaltenen Ergebnisse dieser Zellversuche gezeigt. Der Einsatz von Epinastin löste in den HEK 293 AmOA-Zellen keine Ca²⁺-Ausschüttung aus. Das schon beschriebene durch 50 nM Octopamin ausgelöste Ca²⁺-Signal konnte durch die Applikation einer 5 µM Epinastinlösung sekundenschnell unterdrückt werden. In Abbildung 3-53 werden auch die Ergebnisse der Versuche gezeigt, bei denen **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-*caged* Epinastin in Konzentrationen von 5 µM neben dem Neurotransmitter Octopamin in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt wurden. Wurden die Zellen nur mit der *caged* Epinastin-Verbindung versetzt, trat kein Ca²⁺-Signal auf. Wurde 10 s nach dem Start der Messung der Neurotransmitter zugegeben, erfolgte eine sofortige Ca²⁺-Ausschüttung. Das bereits extrazellulär vorgelegte *caged* Epinastin beeinflusste die vom Octopamin ausgelösten Ca²⁺-Signale nicht. Nach 200 s und 400 s wurde Epinastin aus *caged* Epinastin durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 405 nm freigesetzt. Hier zeigte sich kurzzeitig eine komplette Löschung der Ca²⁺-Antwort. Die zeitlich sehr eingeeengte Wirkung des Epinastins ist wiederum durch die lokale Freisetzung und die schnelle Konzentrationsverminderung durch freie Diffusion der Substanz zu erklären.

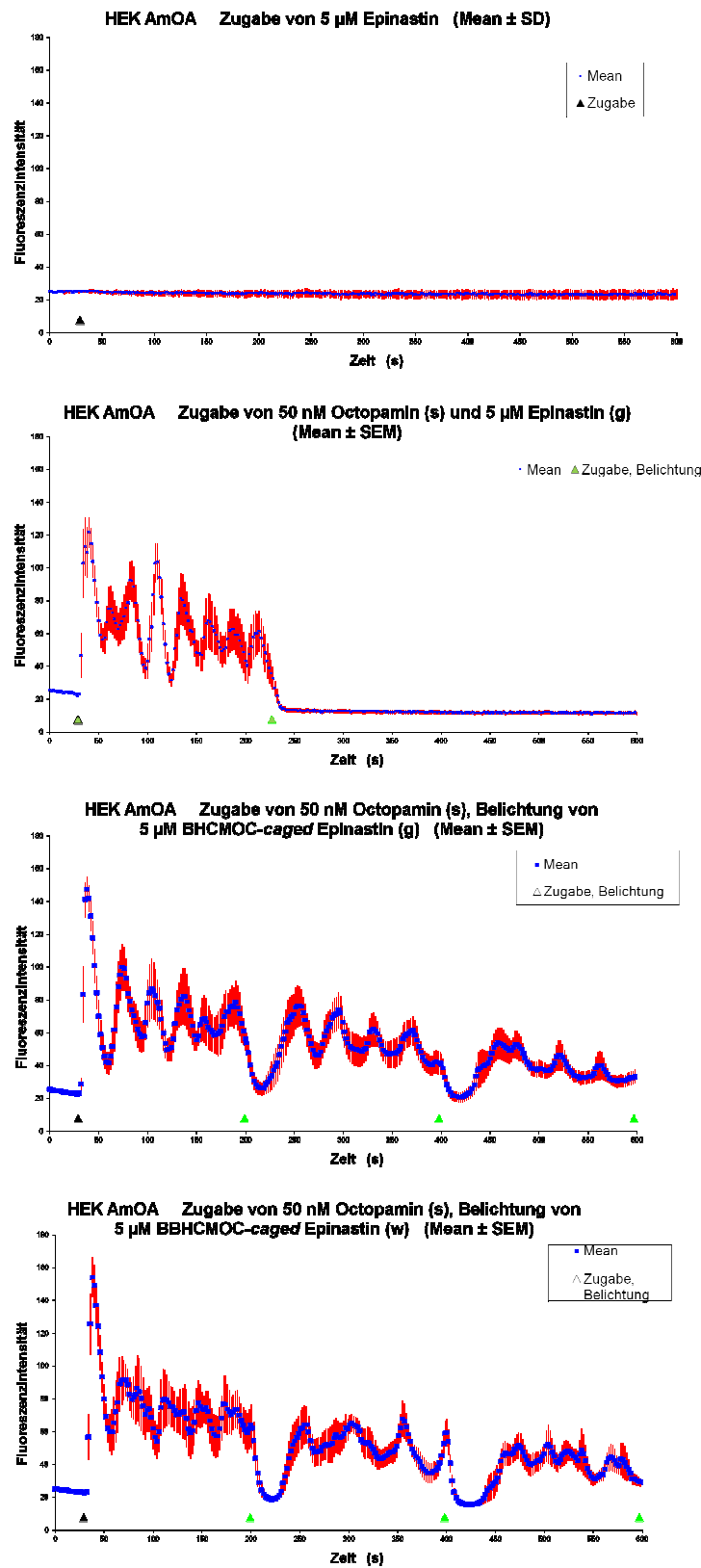


Abbildung 3-53: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen mittels der Fluoreszenz des Ca^{2+} -Indikators FLUO4-AM in HEK 293 AmOA-Zellen bei extrazellulärer Applikation von Epinastin in der Konzentration 5 μM , von Octopamin in der Konzentration von 50 nM und nach 225 s Zugabe von 5 μM Epinastin, von Octopamin in der Konzentration von 50 nM und **BHCOC(100)**- bzw. **BBHCOC-caged Epinastin (102)** in der Konzentration von 5 μM mit Belichtung nach 200 s und 400 s. Die abgebildeten Diagramme zeigen den Mean- \pm SEM-Wert von je 10 vermessenen Zellen.

Es wurde gezeigt, dass Epinastin nicht aber die *caged* Epinastine das Octopamin-Signal unterdrücken. Die *caged* Epinastin-Verbindungen **100** und **102** zeigten gleichfalls keine biologische Eigenaktivität und nach Belichtung wurden die erwarteten Epinastin-Wirkungen gefunden. Damit erfüllten die synthetisierten *caged* Epinastin-Verbindungen **100** und **102** auch in den Zelltests alle Anforderungen und sollten sich prinzipiell für den Einsatz zur gesteuerten Unterdrückung der Octopamin-Wirkung eignen.

3.3.2 Anwendungen der *caged* PSIs

Funktionstests der *caged* Derivate der PSIs Anisomycin (**5**) und Emetin (**4**) wurden in Kooperation mit D. EISENHARDT (FU Berlin) sowie B. WIESNER (FMP Berlin) durchgeführt.

Von Anisomycin waren, wie in der Einleitung beschrieben, die in Abbildung 1-15 gezeigten **p-NB-**, **DMNBOC-**, **BHCMOC-** und **DEACMOC-***caged* Verbindungen bereits bekannt.⁸⁸⁻⁸⁹ 2005 setzten GOARD *et al.* **p-NB-**, **DMNBOC-** und **BHCMOC-***caged* Anisomycin (**108**) in einem *in vitro translation assay* ein. Sie verwendeten den PSI und seine photolabil geschützten Derivate in Konzentrationen von 40 μM . Um diese Konzentrationen im *assay* zu erreichen mussten sie mit einer Stammlösung von 4 mM in DMSO starten. Sie fanden, dass **BHCMOC-***caged* Anisomycin die schnellste und höchste Freisetzungsrates für **5** zeigte. Weiterhin setzten sie **108** in GFP (*Green fluorescence proteine*) transfizierten CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-Zellen ein und wiesen nach, dass das freigesetzte Anisomycin die Bildung neuen GFPs inhibiert. 2010 verwendeten SADOVSKI *et al.* alternativ das **DEACMOC-***caged* Anisomycin in einem *in vitro translation assay*. Sie fanden, dass **DEACMOC-***caged* Anisomycin im Vergleich zu **108** mit einer Konzentration von nur 8 μM eingesetzt zu werden braucht und durch das bathochrom verschobene λ_{max} von 395 nm des **DEACMOC-***caged* Anisomycin die Photolyse auch bei 405 nm durchgeführt werden kann.⁸⁹ **DEACMOC-***caged* Anisomycin wurde nicht *in vivo* (Zellen, Organismen) charakterisiert.

Im Arbeitskreis von D. EISENHARDT soll später der Einfluss der PSIs Emetin und Anisomycin auf das Lernverhalten und die Gedächtnisbildung im ZNS der Honigbiene untersucht werden. Hierfür sollen sowohl *caged* Emetin als auch *caged* Anisomycin genutzt werden. Bisher wurden die Eignung unseres sehr gut wasserlöslichen **BBHCMOC-***caged* Anisomycin-Derivates **110** und der von uns hergestellten ersten *caged* Emetin-Verbindungen **105** und **107** in einem *in vitro assay* und in HeLa-S-Zellen getestet. Ausserdem gibt es erste Resultate zum erfolgreichen Einsatz der **BBHCMOC-***caged* PSIs **107** und **110** in Taufliegen.

***In vitro* Translations-Studien**

Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen wurden im Arbeitskreis von D. EISENHARDT von K. MARTER im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.⁸⁴ Hierbei wurden Emetin und Anisomycin sowie die neu entwickelten *caged* Verbindungen **105**, **107** und **110** in einem *translation assay* eingesetzt. In Abbildung 3-54 A sind die ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven von Emetin und Anisomycin dargestellt. Aus ihnen ist ersichtlich, dass Anisomycin einen deutlich höheren Hemmeffekt auf die Proteinsynthese im *assay* hat als Emetin. Die notwendige Konzentration der PSIs für eine mindestens 80%ige Hemmung beträgt für Emetin 5 μM und für Anisomycin 0,5 μM . Der Test

bezüglich der Eigenaktivität der bei der Photolyse entstehenden **CM**-Alkohole war negativ (Abbildung 3-54 B).

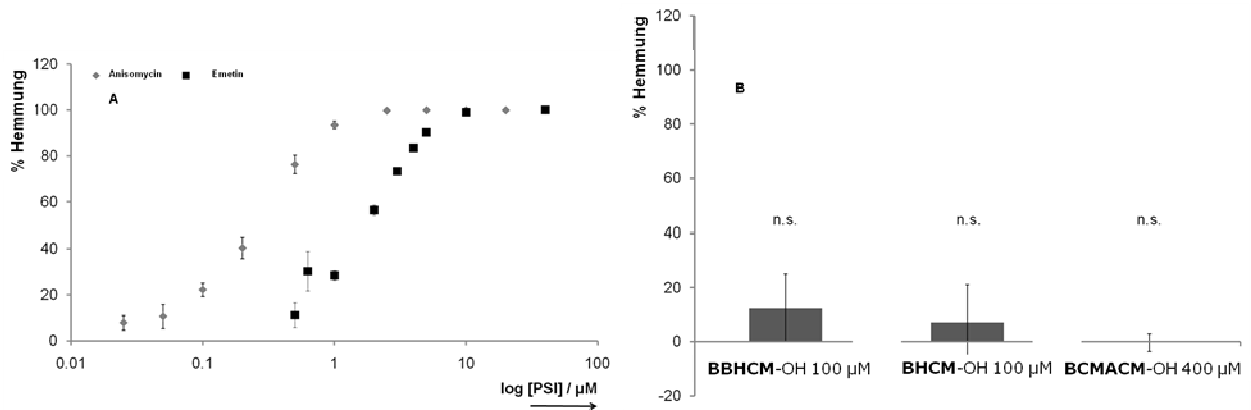


Abbildung 3-54: Vorversuche zum Einsatz der *caged* Verbindungen im *in vitro translation assay*. A) Dosis-Wirkungskurven der PSIs; B) Eigenaktivität der nach der Photolyse erhaltenen Alkohole. Aufgetragen wurden die prozentuale Hemmung (*Mean* \pm *SEM*) der Translation gegen die Konzentration der PSIs (A) und die prozentuale Hemmung (*Mean* \pm *SEM*) der Translation nach Gabe von 100 μM bzw. 400 μM der **CM**-Alkohole (B).¹²⁹

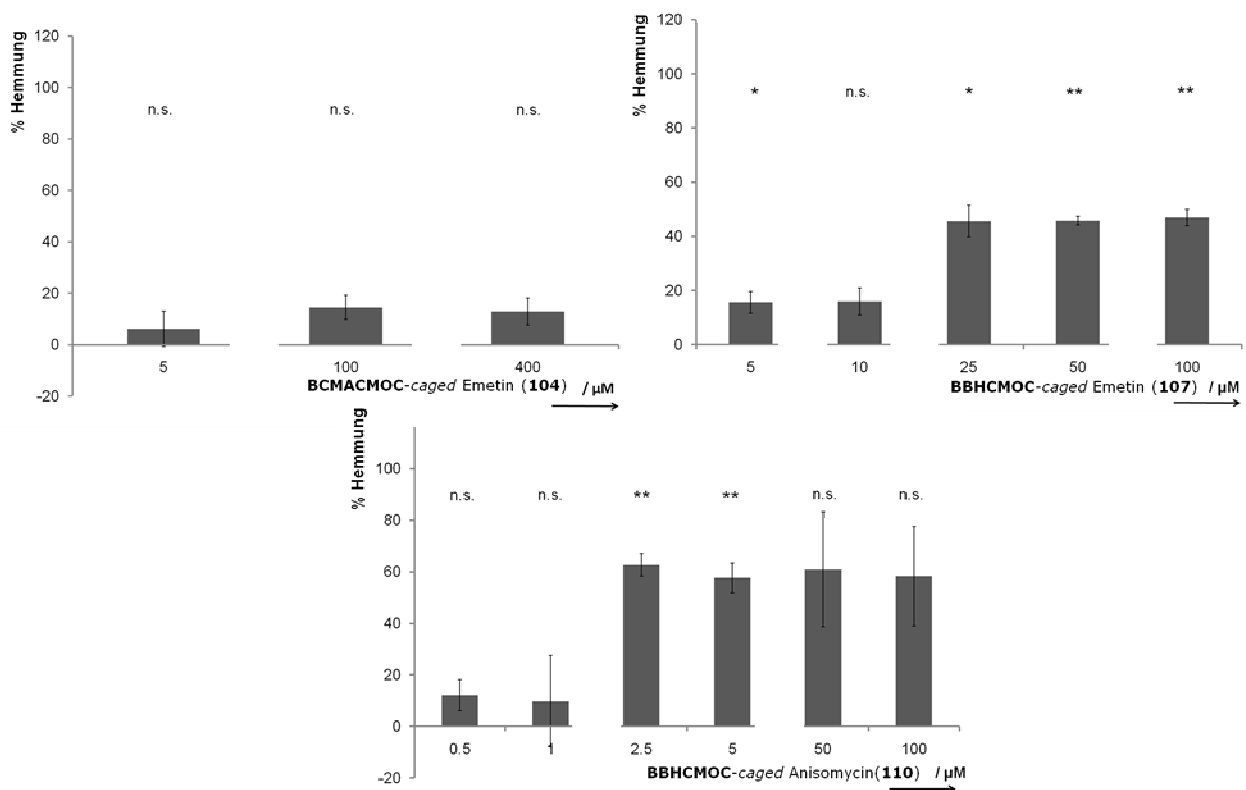


Abbildung 3-55: Biologische Eigenaktivität der *caged* Verbindungen in *in vitro translation assays*. Aufgetragen ist die prozentuale Hemmung (*Mean* \pm *SEM*) der Translation gegen die Konzentration der *caged* Verbindungen 104, 107 und 110.¹²⁹

Der Test über eine mögliche biologische Eigenaktivität der neu entwickelten *caged* Verbindungen, dessen Ergebnisse in Abbildung 3-55 gezeigt werden, ergab beim **BCMAMOC-caged** Emetin keine, beim **BBHCMOC-caged** Emetin bis zu einer Konzentration von 10 μM keine und beim **BBHCMOC-caged** Anisomycin bis zu einer Konzentration von 1 μM keine signifikante biologische Eigenaktivität. Da die *caged*-Emetin Verbindungen in einer Konzentration von 5 μM und die *caged* Anisomycin-

Verbindungen in einer Konzentration von 0,5 μM eingesetzt werden sollen, darf in diesen Konzentrationsbereichen von einer fehlenden biologischen Eigenaktivität der *caged* Verbindungen ausgegangen werden.

Nachdem die Rahmenbedingungen für den Einsatz der *caged* Verbindungen im *in vitro translation assay* geklärt waren, wurde die Hemmung der Proteinsynthese nach Freisetzung der PSIs aus den *caged* Verbindungen im Lysat durch Bestrahlung mit einer LED (*light-emitting diode*) bei 360 nm in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. **BCMACMOC-caged** Emetin benötigte aufgrund des geringen Φ_{chem} -Werts eine längere Bestrahlungszeit, um eine 60%ig. Hemmung der Proteinsynthese zu erreichen. Bei den beiden **BBHCMOC**-geschützten PSIs (vgl. Abbildung 3-56) waren innerhalb der ersten 10 s bereits soviel der PSIs freigesetzt worden, dass eine 60%ig. Hemmung der Proteinsynthese erzielt wurde. Der Unterschied zwischen **107** und **110** zeigte sich nur darin, dass **107** in einer zehnfach höheren Konzentration als **110** eingesetzt werden musste, da Anisomycin als PSI deutlich effektiver wirkt als Emetin.

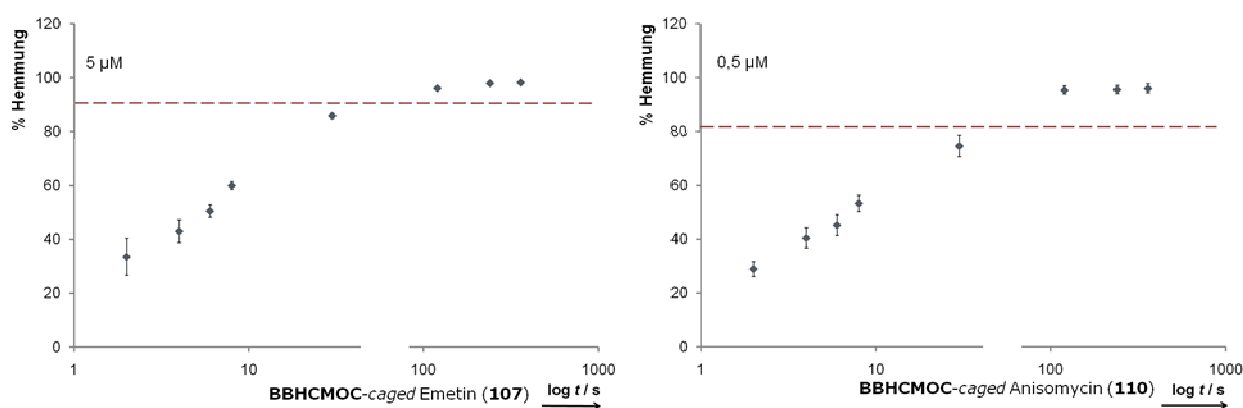


Abbildung 3-56: Hemmung der Proteinsynthese in Abhängigkeit von der Freisetzungsrates der PSIs aus den *caged* Verbindungen nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 360 nm. Aufgetragen ist die prozentuale Hemmung ($Mean \pm SEM$) der Translation gegen die Dauer der Bestrahlung.¹²⁹

Studien der PSIs in HeLa-S-Zellen

Die hier gezeigten Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit der Gruppe um B. WIESNER. Die experimentellen Arbeiten wurden von J. EICHHORST durchgeführt.

Emetin und **BHCMOC-caged** Emetin wurden in HeLa-S Zellen (Gebärmutterhals-Tumorzellen), die mit dem Vektor pE.GFP N1 transient transfiziert wurden, eingesetzt. Die Zellen wurden ausgesät und inkubiert. Anschließend erfolgten die Transfektion mit dem Vektor pE.GFP N1 und die Aufteilung in vier Gruppen. Gruppe A war die Kontrollgruppe. Gruppe B wurde mit 5 μL einer 100 μM Lösung des PSIs in DMSO/Puffer (1/1) behandelt. Gruppe C wurde mit 5 μL einer 100 μM Lösung des *caged* PSIs (**105**, **107**, **108** und **110**) in DMSO/Puffer (1/10) versetzt. Die Gruppen A bis C wurden anschließend 24 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Gruppe D wurde identisch vorbereitet wie Gruppe C, zusätzlich aber nach 1 h Inkubationszeit 1 min mit einer UV-Lampe (HBO 50 W, Carl Zeiss) bestrahlt und anschließend 23 h inkubiert. Die erhaltenen Proben wurden am Konfokalmikroskop (*Laser-Scanning-Mikroskop*

LSM 710-FCS, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, λ_{det} : Band Pass 493–650 nm) untersucht. Vermessen wurden die Anzahl der fluoreszierenden Zellen und die Intensität der Fluoreszenz.

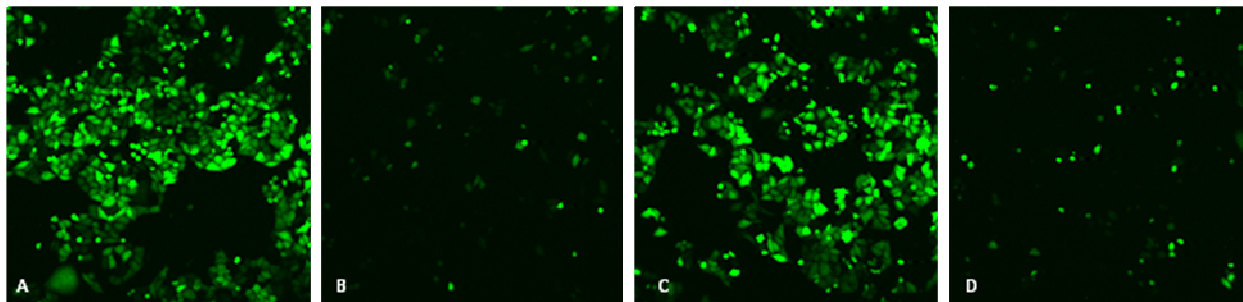


Abbildung 3-57: Am LSM vermessene Fluoreszenzen in HeLa-S pE.GFP N1 Zellen: A) Zellen nach 24 h Expression (Kontrolle), B) Zellen in Gegenwart von Emetin nach 24 h Expression, C) Zellen in Gegenwart von **BHC Moc-caged** Emetin nach 24 h Expression, D) Zellen in Gegenwart von **BHC Moc-caged** Emetin und 1 min Bestrahlung mit UV-Licht nach 24 h Expression.

In Abbildung 3-57 sind beispielhaft die erhaltenen Ergebnisse mit Emetin und **BHC Moc-caged** Emetin (**105**) aufgeführt. Beim Vergleich zwischen Bild A (Probe der Gruppe A) und Bild C (Probe der Gruppe C) sieht man kaum Unterschiede in der Anzahl der fluoreszierenden Zellen und der Fluoreszenzintensität, somit ist keine Eigenaktivität von Verbindung **105** im gewählten System zu beobachten. Die in Bild B beobachtete geringe grüne Fluoreszenz beweist die fehlende GFP-Synthese und somit die Hemmung der Proteinsynthese in den Proben der Gruppe B, die durch Applikation des PSIs Emetin erhalten wurde. Ein vergleichbares Erscheinungsbild zeigt auch das Bild D, welches von einer Probe der Gruppe D aufgenommen wurde. Da vor diesen Versuchen abgeklärt wurde, dass 1 min Bestrahlung der Zellen keinen Einfluss auf die Zellen bzw. die GFP-Synthese hat, kann geschlossen werden, dass das bei der Photolyse entstandene Emetin die Proteinsynthese des GFP inhibierte.

Der Einsatz von **BBHC Moc-caged** Emetin sowie von Anisomycin und **BHC Moc-** bzw. **BBHC Moc-caged** Anisomycin in diesem Testsystem brachte analoge Ergebnisse.

FACS-Messungen

Für die gleichfalls von J. EICHHORST und B. WIESNER durchgeführten FACS (*Fluorescence activated cell sorting*)-Messungen wurden die Zellen unter identischen Bedingungen wie vorstehend beschrieben vorbereitet. Die nach 24 h Inkubation erhaltenen Proben wurden gewaschen, in PBS (*phosphate buffered saline*) aufgenommen und zweimal zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde erneut in PBS aufgenommen und in einem FACS-Gerät (FACS-Calibur, Argon Laser, 488 nm) vermessen. Die aus diesen Messungen erhaltenen statistischen Aussagen über die GFP-Synthese in den HeLa-S pE.GFP N1 Zellen werden in den Abbildungen 3-58 und 3-59 dargestellt.

Zu Beginn wurde mit Hilfe der Dosis-Wirkungskurven für Emetin in den HeLa-S pE.GFP N1 Zellen eine Endkonzentration von 500 nM Emetin für die vollständige Hemmung der Proteinsynthese in den Zellversuchen abgeleitet.

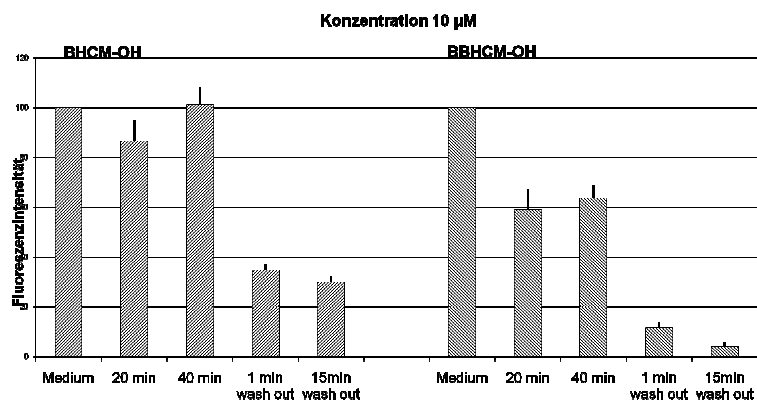


Abbildung 3-58: Aufnahme von **BHCM-OH** bzw. **BBHCM-OH** in HeLa-S pE.GFP N1 Zellen nach Inkubation ohne Auswaschen für 20 min und 40 min, nach Inkubation für 40 min, Auswaschen und 1 min bzw. 15 min Warten.

Da die PSIs in der Zelle wirken, wurde zur Klärung der Membrangängigkeit der eingesetzten Verbindungen schematisch an den **CM**-Alkoholen **BHCM-OH** (**16**) und **BBHCM-OH** (**23**), die näherungsweise strukturell den *caged* PSIs entsprechen, untersucht, ob sie tatsächlich in die Zelle diffundieren. Gemessen wurde die Eigenfluoreszenz der Alkohole innerhalb von nicht transfizierten HeLa-S Zellen (Abbildung 3-58). Es zeigte sich, dass nach 20 bzw. 40 min Inkubation relativ hohe Konzentrationen der Alkohole in der Zelle nachweisbar waren. Bei den 1 min bzw. 15 min nach Auswaschen der Zellen erfolgten Messungen konnten in der Zelle die Alkohole ebenfalls, allerdings mit geringerer Konzentration nachgewiesen werden. Die Abbildung 3-58 dokumentiert auch, dass **BHCM-OH** besser zellmembranpermeabel ist als **BBHCM-OH**.

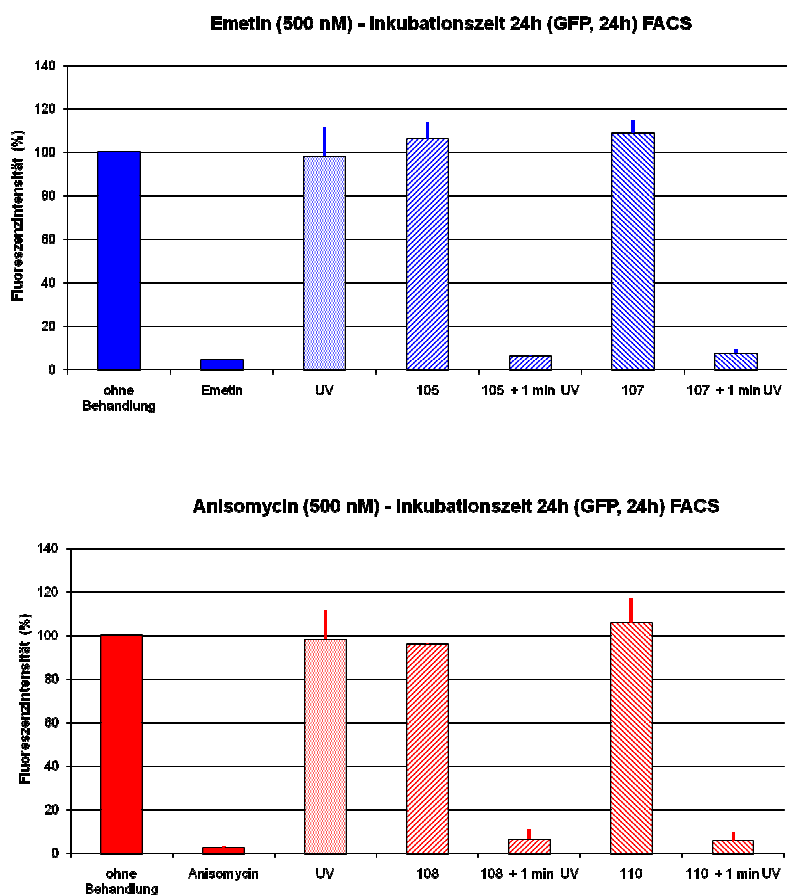


Abbildung 3-59: *Mean* ± *SD*-Werte der FACS-Messungen zur Wirkung von Emetin, Anisomycin, **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-*caged* Emetin (**105** bzw. **107**) sowie **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-*caged* Anisomycin (**108** bzw. **110**) in HeLa-S pE.GFP N1 Zellen nach 24 h Inkubationszeit. Es wurden 3 unabhängige Versuche mit jeweils 10 000 Zellen durchgeführt.

Schließlich wurden die Wirkungen der PSIs bzw. der *caged* PSI-Verbindungen in Konzentrationen von jeweils 500 nM in den HeLa-S pE.GFP N1 Zellen untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Abbildung 3-59 aufgeführt. Diese Zellversuche belegen, dass die Bestrahlung der Zellen für 1 min mit UV-Licht keine Auswirkung auf die Synthese von GFP hat und dass der Einsatz von 500 nM Emetin bzw. Anisomycin zur fast vollständigen Inhibierung der GFP-Synthese führt. Bei den mit **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-*caged* PSIs (**105**, **107**, **108** und **110**) behandelten Zellen konnte keine Inhibierung der GFP-Synthese beobachtet werden. Somit zeigen die neu entwickelten *caged* PSI-Verbindungen auch an diesem Modell keine biologische Eigenaktivität. In den Fällen, bei denen die Zellen zunächst mit *caged* PSIs inkubiert und danach 1 min mit UV-Licht bestrahlt wurden, wurde eine ähnlich geringe Synthese von GFP wie bei den nur mit Emetin oder Anisomycin behandelten Zellen beobachtet. Durch HPLC-Messungen konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Verbindungen **105**, **107**, **108** und **110** bei einer Konzentration von 500 nM in den Zelllösungen und UV-Bestrahlung für 1 min Emetin bzw. Anisomycin zu 100 % in der Lösung freisetzen. Somit erfüllen die neuen **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-*caged* Emetine bzw. Anisomycine unter den beschriebenen Versuchsbedingungen alle wichtigen Anforderungen an gute Phototrigger. Damit wurde nachgewiesen, dass die *caged*

Verbindungen **105**, **107**, **108** und **110** erfolgreich zur örtlich gesteuerten Freisetzung der PSIs **4** und **5** eingesetzt werden können.

Grundsätzlich werden die PSIs im μs -Bereich freigesetzt. Da es sich bei der Proteinsynthese aber nicht um einen schnellen Prozess handelt, ist die Geschwindigkeit der Freisetzung hier im Prinzip unwichtig. Ein wichtiger Parameter ist aber die Photoeffizienz, $\Phi_{\text{chem}} \times \epsilon$, da die Bestrahlungsdauer möglichst gering gehalten werden soll, um Schädigungen der Zellen vorzubeugen. Je höher das Produkt aus $\Phi_{\text{chem}} \times \epsilon$ ist, desto höhere Konzentrationen des Biomoleküls werden in der kurzen Bestrahlungszeit freigesetzt. Die Photoeffizienz (siehe Kapitel 3.2.3) ist bei den **BHCMOC**- bzw. **BBHCMOC-caged** PSI-Verbindungen relativ hoch. Sie sind deshalb auch aus dieser Sicht sehr gut geeignete Phototrigger. Die Verbindung **104** mit dem **BCMAMC**-Chromophor ist dagegen wegen der deutlich geringeren Photoeffizienz nur bedingt einsetzbar.

Studien in *Drosophila melanogaster*

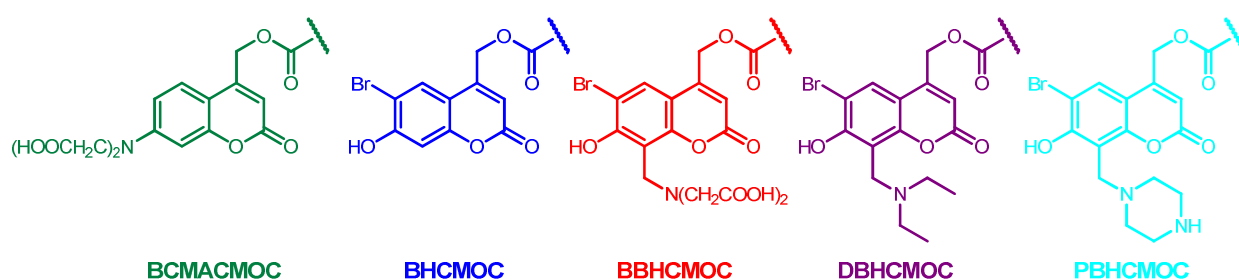
Wie wichtig die Entwicklung extrem gut wasserlöslicher *caged* Verbindungen ist, zeigt sich bei dem geplanten Einsatz der Verbindungen an Insekten. Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln als Lösungsvermittler ist bei den Tierversuchen nicht möglich, da diese auch Einflüsse auf die zu beobachtende Proteinsynthese zeigen.⁸⁴ Die Verbindungen müssen im 5-10 mM-Bereich in reinen Pufferlösungen löslich sein, um diese den Tieren über die Nahrung zuzuführen. Damit kamen nur die **BBHCMOC-caged** Verbindungen **107** und **110** für den Einsatz an der Honigbiene oder Taufleie in Betracht. In den gegenwärtig laufenden Studien von K. MARTER (Arbeitskreis D. EISENHARDT), in denen die *caged* Verbindungen **107** und **110** in *Drosophila melanogaster* zur Anwendung kommen, konnte bereits gezeigt werden, dass aus den *caged* Verbindungen im Kopf von Insekten örtlich aufgelöst PSIs freigesetzt werden können.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von *caged* Verbindungen für ausgewählte Biomoleküle, die langwellig anregbar sind und sich durch eine möglichst schnelle und effiziente Photofreisetzung der Biomoleküle auszeichnen. Weitere wichtige Kriterien für die *caged* Verbindungen waren eine gute Löslichkeit in wässrigen Pufferlösungen sowie eine mögliche 2-Photonen-Anregbarkeit.

Konkret wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene *Caging*-Reagenzien für die Inaktivierung der Neurotransmitter Octopamin und Dopamin, für den Octopamin-Antagonisten Epinastin, für die Proteinsyntheseinhibitoren (PSIs) Emetin und Anisomycin, für den Protonophor CCCP und den Riechstoff Bourgeonal eingesetzt. *Caged* Verbindungen von Octopamin, Epinastin, Emetin und CCCP wurden erstmalig synthetisiert. Die verwendeten *Caging*-Reagenzien waren nur teilweise bekannt. Die wichtigsten wurden neu entwickelt bzw. erstmalig zum *Cagen* von OH- bzw. NH₂-Funktionen verwendet. Syntheseverfahren für diese Moleküle sowie für die daraus gebildeten *caged* Verbindungen wurden erarbeitet. Die erhaltenen Phototrigger wurden umfassend chemisch und photochemisch charakterisiert, zudem wurden einige von ihnen biologischen Funktionstests unterzogen.

Mit dem **BBHCMOC**-, dem **PBHCMOC**- und dem **DBHCMOC**-Chromophor wurden neue photolabile Cumarinylmethyl-Schutzgruppen eingeführt. Sie besitzen in 8-Position am Cumaringerüst hydrophile Substituenten und zeichnen sich gegenüber der bekannten **BHCMOC**-Schutzgruppe durch eine stark verbesserte Löslichkeit sowie eine geringere pH-Abhängigkeit des Absorptionsverhaltens und gegenüber der **BCMACMOC**-Schutzgruppe durch eine deutlich höhere Photoeffizienz aus. Die Einführung der Substituenten in 8-Position gelang ausgehend von 6-Brom-7-hydroxy-cumarinen auf elegante Weise durch Mannich-Reaktion.



Mit **BBCMNP-ED** wurde ein neues *Caging*-Reagenz für Carbonylverbindungen entwickelt. Davon abgeleitete *caged* Carbonylverbindungen, strukturell 1,3-Dioxolane, zeichnen sich durch verhältnismäßig hohe photochemische Quantenausbeuten sowie durch gute Löslichkeiten in wässrigen Puffern aus.

Octopamin, Dopamin und Epinastin wurden mit der **BCMACMOC**-, **BHCMOC**- und der neuen **BBHCMOC**-Schutzgruppe an der Aminofunktion geschützt. Die neu entwickelten **PBHCMOC**- und

DBHCMOC-Schutzgruppen wurden exemplarisch zum *Cagen* von Octopamin an der Aminofunktion genutzt.

Durch Maskieren jeweils einer der beiden Hydroxyfunktionen mit dem **BHCMOC**-Chromophor konnte Octopamin selektiv an jeder einzelnen funktionellen Gruppen geschützt werden, was bei der Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Neurotransmitter hilfreich sein sollte.

Die chemischen bzw. photochemischen Untersuchungen zu den erhaltenen *caged* Neurotransmittern und zu *caged* Epinastin ergaben, dass die **BCMCMOC**-Derivate **69**, **70** und **99** zwar gute Löslichkeiten und Absorptionseigenschaften in wässrigen Pufferlösungen besitzen, aber im Vergleich zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *caged* Neurotransmittern deutlich niedrigere photochemische Quantenausbeuten aufweisen, was eine schlechtere Photoeffizienz zur Folge hat. Die **BHCMOC**-*caged* Neurotransmitter **72**, **73** und **100** weisen hingegen gute Photoeffizienzen auf, besitzen aber mit Ausnahme von *O*²-**BHCMOC**-*caged* Octopamin (**97**) nur relativ geringe Löslichkeiten unter physiologischen Bedingungen. Erst mit der Einführung der neuen **BBHCMOC**-, **PBHCMOC**- bzw. **DBHCMOC**-Chromophore zum *Cagen* der Neurotransmitter gelang die Synthese von sehr gut löslichen *caged* Dopamin- und Octopamin-Derivaten mit guten Photoeffizienzen.

Die hier beschriebenen *caged* Neurotransmitter fluoreszieren im Vergleich zu den jeweiligen **CM**-Alkoholen weniger stark und haben ihr Fluoreszenzmaximum im Bereich von 463 bis 498 nm. Das *O*¹-**BHCMOC**-*caged* Octopamin (**89**) besitzt mit $\Phi_{fl} = 0,06$ die geringste Fluoreszenzquantenausbeute und mit $\Phi_{chem} = 0,21$ die höchste photochemische Quantenausbeute aller in dieser Arbeit untersuchter **BHCM**-Verbindungen.

Für die Modellverbindungen **BBHCMOC**-(**78**), **PBHCMOC**-(**81**) und **DBHCMOC**-*caged* Octopamin (**82**) wurde eine für *caged* Verbindungen hohe 2-Photonen-Anregbarkeit nachgewiesen, womit sie für den Einsatz in Gewebsschnitten sehr gut geeignet sind.

Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie wurde erstmals die Geschwindigkeitskonstante der primären Photospaltung bei **CMOC**-*caged* Verbindungen ermittelt. Die erhaltenen Werte für **BCMCMOC**-(**70**), **BHCMOC**-(**73**) und **BBHCMOC**-*caged* Dopamin (**79**) zeigen, dass die Photospaltungen im Nanosekundenbereich erfolgen. Zur Bestimmung der Freisetzungsgeschwindigkeit von CO₂ aus **BBHCMOC**-*caged* Octopamin (**78**), welche mit der Freisetzungsgeschwindigkeit von Octopamin gleichgesetzt werden kann, wurden zeitaufgelöste IR-Untersuchungen durchgeführt. Die in Zusammenarbeit mit A. BARTH (Stockholm) durchgeführten Messungen zeigen, dass CO₂ und damit Octopamin innerhalb von 200 ms aus **78** freigesetzt wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen **BHCMOC**-, **BBHCMOC**-, **PBHCMOC**-, **DBHCMOC**- und *O*¹-**BHCMOC**-*caged* Octopamin sowie **BHCMOC**- und **BBHCMOC**-*caged* Epinastin wiesen in HEK 293 Zellen, die den AmOA1A-Rezeptor tragen, keine nachweisbaren biologischen Eigenaktivitäten auf und setzten durch Bestrahlung mit Licht örtlich und zeitlich gesteuert Octopamin bzw. Epinastin in ausreichenden Mengen frei. Damit sind die entwickelten *caged* Octopamin- und *caged* Epinastin-Verbindungen hervorragend als Werkzeuge für die geplanten Untersuchungen im ZNS der Honigbiene geeignet.

Der PSI Anisomycin wurde zu Vergleichszwecken nach einem teilweise neuen Syntheseweg in das bekannte **BHCMOC-caged** Anisomycin **108** überführt. Außerdem wurde die Aminofunktion des Anisomycins mit dem neu entwickelten Chromophor **BBHCMOC** geschützt.

Der wenig untersuchte und bisher noch nicht photolabil geschützte PSI Emetin wurde in guten bis sehr guten Ausbeuten zu **BHCMOC**-, **BBHCMOC**- und **BCMAMOC**-geschützten Emetin-Verbindungen umgesetzt. Bei der Charakterisierung der erhaltenen *caged* PSIs bestätigten sich die schon bei den Neurotransmittern gefundenen Erkenntnisse, der vergleichsweise schlechten photochemischen Quantenausbeute für das **BCMAMOC**-geschützte Emetin (**104**) und der geringen Löslichkeit der **BHCMOC**-Verbindungen **105** und **108**. Dagegen zeigten die neu gewonnenen *caged* Verbindungen **BBHCMOC-caged** Anisomycin (**110**) und **BBHCMOC-caged** Emetin (**107**) sehr gute Eigenschaften bezüglich Absorption, Stabilität, Löslichkeit und Photoeffizienz.

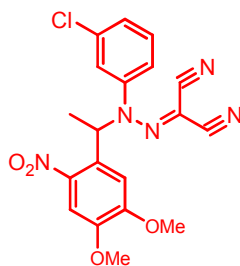
Auch für **BBHCMOC-caged** Emetin (**107**) wurde nachgewiesen, dass es durch 2-Photonen-Anregung photolysiert werden kann, was Verbindung **107** auch für Untersuchungen in Gewebsschnitten qualifiziert. Bei den 2-Photonen-Anregungen wurde zusätzlich gezeigt, dass **107** unter gleichen Bestrahlungsbedingungen dreimal soviel Emetin freisetzt wie die bekannte **BHCMOC-caged** Verbindung **108** Anisomycin.

Durch zeitaufgelöste fluoreszenzspektroskopische Messungen konnten auch bei den *caged* Emetin-Verbindungen **104**, **105** und **107** sowie bei **BBHCMOC-caged** Anisomycin (**110**) nachgewiesen werden, dass der erste Schritt der Photospaltung im ns-Bereich stattfindet. Durch zeitaufgelöste IR-Messungen wurde nachgewiesen, dass Anisomycin aus dem *caged* Derivat **110** innerhalb von 56 ms und Emetin aus der *caged* Verbindung **107** innerhalb von 1 s freigesetzt werden.

Der Einsatz der *caged* PSIs in einem *in vitro translation assay* bestätigte die bei den photochemischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse. Bei den **BCMAMOC**-Derivaten war gegenüber den **BHCMOC**- bzw. **BBHCMOC**-Verbindungen eine deutlich höhere Bestrahlungszeit nötig, um die gleiche Menge an PSI freizusetzen. Die **BHCMOC-caged** PSIs konnten, da sie in reinem Puffer gelöst werden mussten, nur in relativ geringen Konzentrationen eingesetzt werden, die zwar im *in vitro translation assay* ausreichend waren, aber beim späteren Einsatz in der Honigbiene bei weitem nicht ausreichen. Nur die neu entwickelten Verbindungen **BBHCMOC-caged** Anisomycin (**110**) und **BBHCMOC-caged** Emetin (**107**) konnten in hohen Konzentrationen und bei relativ geringer Bestrahlungszeit in einem *in vitro translation assay* eingesetzt werden. Alle beschriebenen *caged* PSIs wiesen keine biologische Eigenaktivität auf.

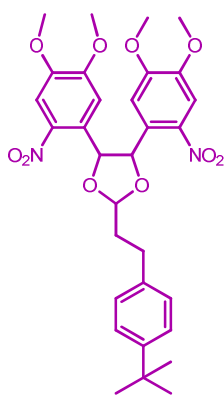
Die **BHCMOC**- und **BBHCMOC-caged** PSIs wurden auch in Untersuchungen in Hela-S pE.GFP N1 Zellen eingesetzt. Alle vier *caged* Verbindungen zeigten keinerlei Hemmung auf die GFP-Synthese und konnten innerhalb kurzer Bestrahlungszeit komplett photolytisch gespalten werden, was zur gewünschten Hemmung der GFP-Synthese durch das freigesetzte Emetin bzw. Anisomycin führte.

Für die momentan laufenden Untersuchungen, bei denen die *caged* PSIs als Werkzeuge im ZNS der Tauffliege und der Honigbiene eingesetzt werden, wurden die neuen **BBHCMOC**-Derivate **107** und **110** ausgewählt, da hier die *caged* Derivate der PSIs in Konzentrationen von ≥ 5 mM in reinem Puffer eingesetzt werden müssen und die Tiere nur geringe Mengen des eingesetzten Lichtes vertragen. Diesen Ansprüchen werden nur die neu entwickelten **BBHCMOC**-Verbindungen gerecht.

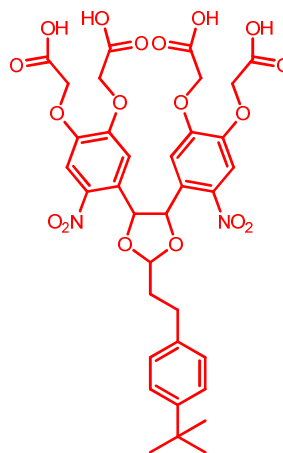


DMNPE-caged CCCP (111)

Für die erstmalige Herstellung eines *caged* Ionophors wurde im Rahmen dieser Arbeit der Protonophor CCCP mit der **DMCM**- und der **DMNPE**-Gruppe geschützt. Die Synthese der beiden potentiellen *caged* Verbindungen gelang in guten Ausbeuten. Bei der photochemischen Charakterisierung wurde festgestellt, dass das **DMCM**-Derivat von CCCP (**112**) bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 330 bzw. 360 nm keine nennenswerte Photolysereaktion eingeht und somit kein Phototrigger für CCCP ist. Die Verbindung **DMNPE-caged CCCP (111)** hingegen hat eine ausreichend gute Photoeffizienz und ist in MeCN/Puffer (5/95) hydrolysestabil. Lediglich die geringe Löslichkeit in wässrigen Pufferlösungen setzt der Verwendung von **111** Grenzen. Für den Einsatz von **DMNPE-caged CCCP (112)** in biologischen Untersuchungen an Ionenkanälen liegen bisher keine Ergebnisse vor.



BDMNP-ED-caged Bourgeonal (113)



BBCMNP-ED-caged Bourgeonal (115)

Erfolgreich konnten auch **BDMNP-ED-caged Bourgeonal** und **BBCMNP-ED-caged Bourgeonal** hergestellt werden. Beide Verbindungen zeigten eine ausreichend hohe Photoeffizienz. Durch Einführung der beiden hydrophilen Substituenten am Phenylrest gelang eine Erhöhung der Löslichkeit von 3 μM (**BDMNP-ED-caged Bourgeonal**) auf $\gg 50 \mu\text{M}$ (**BBCMNP-ED-caged Bourgeonal**) in MeCN/HEPES-Puffer (5/95). Die Ergebnisse von biologischen Untersuchungen liegen bisher noch nicht vor.

Insgesamt wurde eine Reihe neuer interessanter *caged* Verbindungen entwickelt, die gegenwärtig und in naher Zukunft in biologischen Untersuchungen eingesetzt werden. Darüberhinaus wurden wertvolle Erkenntnisse über die Vor- und Nachteile verschiedener Chromophore erhalten. Als Ausblick kann festgehalten werden, dass Cumarinyl-Chromophore ein großes Potential für die Entwicklung optimaler

caged Verbindungen haben. Wie hier gezeigt, haben insbesondere [6-Brom-7-hydroxy-(cumarin-4-yl)]methoxycarbonyl-Chromophore, die zusätzlich hydrophile Substituenten in der 8-Position aufweisen, entscheidene Vorteile. Der Einsatz der neuen **BBHCMOC**-, **PBHCMOC**- und **DBHCMOC**-Schutzgruppen für die Blockierung funktioneller Gruppen an Biomolekülen wird generell zu verbesserten *caged* Verbindungen führen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Betrachtung der Membrangängigkeit. Von **PBHCMOC**- und **DBHCMOC**-geschützten Biomolekülen werden einerseits eine hohe Löslichkeit in wässrigen Puffern und andererseits auch eine Membrangängigkeit erwartet.

Die Verwendung der 8-substituierten 6-Brom-7-hydroxy-cumarinylmethyl-Schutzgruppen für die Inaktivierung von Biomolekülen mit funktionellen Säuregruppierungen, SH- und C=O-Funktionen sollte die Anwendungsbreite entsprechender *caged* Verbindungen erweitern.

5 Experimenteller Teil

5.1 Physikalische Messgeräte

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$; $^{13}\text{C-NMR}$)

Die NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern *Bruker DPX 300* bzw. *Bruker DPX 600* gemessen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben, wobei die Kalibrierung auf $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (^1H : 2,50, ^{13}C : 39,52) bzw. CDCl_3 (^1H : 7,26, ^{13}C : 77,0) erfolgte. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale fand gegebenenfalls über zweidimensionale homo- und heteronukleare Spektren (H-H-COSY, HMQC und HMBC) statt – die Numerierung orientiert sich an der Nomenklatur der einzelnen Verbindungen. Die Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben.

Bei der Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale der *caged* Emetin-Verbindungen wurde eine Grenze der zur Verfügung stehenden NMR-Auflösungen erreicht. Somit erfolgte die eindeutige Zuordnung Signal zu Atom nur bei mit 1D- oder 2D-Spektren zuordenbaren Signalen. Bei den verbliebenen ^1H - und ^{13}C -Signalen wurden lediglich die chemischen Verschiebungen angegeben. Das komplett zugeordnete NMR-Spektrum des reinen Emetins wurde bereits veröffentlicht.^{91b} Es wurde allerdings in CDCl_3 vermessen und somit ergaben sich kleine Abweichungen durch andere Viskosität und durch Veränderungen an der Aminofunktion der Emetin-Verbindungen. Ein ^{13}C -Signal liegt eindeutig unter dem DMSO-Signal und kann daher nicht genauer angegeben werden.

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden mit einer LCMS-Kopplung von einer *Acquity UPLC (Waters)* mit einer ESI-TOF-Einheit *LCT Premier (Waters Micromass Technologies)* aufgenommen. Die Trennung erfolgte dabei auf einer *Ascentis Express C18 Säule* (2,7 μm , 30 mm x 2,1 mm, *Supelco*) bei einer Flußrate von 0,2 ml min^{-1} mit linearen Gradienten und den Eluenten A H_2O und B MeCN (jeweils mit 0,05 % TFA). Hochauflösende Massenspektren (HRMS) wurden auf einem *Agilent 6210 ESI-TOF* bzw. *Agilent 6220 ESI-TOF* gemessen, welche mit einem HPLC-System der 1200er Serie gekoppelt waren. Die Analyse der Proben erfolgte durch Elution mit einem Gemisch von $\text{H}_2\text{O/MeOH}$ (1/1), versetzt mit 0,1 % HCOOH . Es wurde mit etwa 1 μM Lösungen gearbeitet. Alle Werte sind in atomaren Masseneinheiten m/z angegeben.

UV/Vis-, Fluoreszenz- und Phosphoreszenzspektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden mit einem *Jasco V-630 Spectrophotometer* gemessen. Die Fluoreszenzspektren wurden auf einem *Jasco FP-6500* aufgenommen. Die Messung der Phosphoreszenzspektren erfolgte mit einem *Fluoromax-4P Spectrofluorometer (HORIBA Jobin Yvon)*.

IR-Spektroskopie

Die Spektren wurden auf einem *Tensor 27* der Firma *Bruker Optik* (7500 bis 370 cm^{-1} mit Standard-KBr-Strahlenteiler; Hochempfindlichkeits-DLATGS-Detektor mit KBr-Fenster; *Smart MIRacle ATR* mit *Single Reflection*, *ZnSe Crystal-clamp-MIRacle High Pressure Clamp*) gemessen.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem *SMP3* der Firma *Bibby Sterilin Ltd.* bzw. *APA II* der Firma *Schorpp Gerätetechnik* ermittelt und sind unkorrigiert angegeben.

5.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die analytische DC wurde auf Glasplatten an Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F_{254} der Firma *Merck* durchgeführt. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 365 nm verwendet.

Säulenchromatographie (SC)

Präparative SC wurde in Normalglassäulen mit Kieselgel (Porendurchmesser 60 Å, Partikelgröße 30-60 μm) der Firma *J. T. Baker* als Flash-Chromatographie mit N_2 -Überdruck durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungsmittel ist in Volumenanteilen angegeben.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die analytische HPLC wurde ein *Shimadzu LC-20* System (Degaser *DGU-20A3*, Autosampler *SIL-20A*, Controller *CBM-20A*), ausgestattet mit einem DAD-UV-Detektor (*SPD-M20A*) und einem Fluoreszenz-Detektor (*RF-10AXL*), eingesetzt. Die Trennungen wurden auf einer *EC 250/4 Nucleodur 100-5 C18 ec* Säule (100 Å, 5 μm , 250 mm x 4 mm, *Macherey-Nagel*) und einer *RP-Amid Ascentis Express* Säule (15 cm x 4,6 mm, 2,7 μm , *Sigma Aldrich*) bei einer Flußrate von 1 ml min^{-1} und 40 °C Säulentemperatur durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 50 μl und die Probenkonzentration bis auf Ausnahmen 50 μM .

Für die präp. HPLC kam ein *Shimadzu LC-8A* System (Controller *SCL-10AVP*) mit einem UV-Detektor (*SPD-M20A*) zur Anwendung. Die Trennungen wurden auf einer *Nucleodur 100-5 C18 ec* Säule (100 Å, 5 μm , 250 mm x 21 mm, *Macherey-Nagel*) bei RT und bei einer Flußrate von 13,8 ml min^{-1} oder 10,0 ml min^{-1} durchgeführt.

Es wurde mit linearen Gradienten und den Eluenten A H_2O (mit 0,1 % TFA) und B MeCN gearbeitet.

5.3 Arbeitsweise, Lösungsmittel, Chemikalien und Substanzcharakterisierung

Die Ausgangsverbindungen und Lösungsmittel für die Synthesen wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Merck*, *Lancaster*, *J. T. Baker*, *Acros*, *TCI Europe* bzw. *Riedel-de Haën* bezogen. Für die HPLC wurden MeCN (HPLC grade) von *J. T. Baker* und gereinigtes Wasser (*Milli-Q-Plus* von *Millipore*) verwendet.

Substanzextrakte in organischen Lösungsmitteln wurden über $\text{MgSO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$ getrocknet und das Solvens bei 40 °C Wasserbadtemperatur am Rotationsverdampfer entfernt. Eventuell verbliebene Lösungsmittelreste wurden im Hochvakuum ($p \leq 10^{-3}$ mbar) entfernt. Substanzen in wässrigen Lösungen wurden durch Lyophilisieren mit einer *Alpha 1-2* Anlage (*Christ*) gefriergetrocknet. Reaktionen mit feuchtigkeits- oder luftempfindlichen Verbindungen wurden in ausgeheizten Glasapparaturen unter Schutzgas (N_2) durchgeführt. Die Trocknung und Aufbewahrung wasserfreier Lösungsmittel erfolgte über Molekularsieb (*Fluka UOP Typ 3A*, Porendurchmesser 3 Å). Die verwendete HEPES-Pufferlösung enthielt 10 mM HEPES und 120 mM KCl. Der notwendige pH von 7,2 wurde mit 2M KOH-Lösung eingestellt. Für die Phosphatpufferlösung (nach Sörensen, pH 7,2) wurden 8,55 g Na_2HPO_4 und 2,54 g KH_2PO_4 in einem Liter dest. H_2O gelöst und der pH-Wert wurde mit verd. H_3PO_4 der eingestellt. Beide Pufferlösungen wurden nach Herstellung filtriert und autoklaviert.

Alle synthetischen und analytischen Arbeiten wurden unter Gelblicht und in braun gefärbten Glasgefäßen durchgeführt.

Löslichkeiten und Hydrolysestabilitäten

Die Bestimmung der maximalen Löslichkeit (Sättigungskonzentration $c_{\text{sätt}}$) der synthetisierten *caged* Verbindungen erfolgte in MeCN/HEPES-Pufferlösung bzw. MeCN/Phosphatpuffer-Lösung (5/95). Dazu wurde eine 10 mM-Suspension der Verbindungen hergestellt, welche im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der klare Überstand mit Hilfe der analytischen HPLC analysiert (mindestens 3 Läufe mit konstanter Peakfläche). Den erhaltenen Peakflächen konnte durch Vergleich mit Peakflächen dieser Verbindungen, bei denen mit bekannter Konzentration gearbeitet wurde, eine Sättigungskonzentration zugeordnet werden.

Für die Bestimmung der Hydrolysestabilitäten wurden die Lösungen nach 24 h bei RT und im Dunkeln erneut in der analytischen HPLC vermessen. Hier wurden dann über eventuelle Veränderungen bei den Peakflächen Rückschlüsse über die Hydrolysestabilität in diesen Medien gezogen.

Photochemische Quantenausbeute

Für alle photochemischen und photophysikalischen Experimente wurden UV- bzw. Fluoreszenz-Quarzküvetten mit einer Weglänge von 1 cm verwendet. Die Photolyse der geschützten Verbindungen in Lösung [50 μM in MeCN/Pufferlösung (5/95)] wurde mit einer Hochdruck-Quecksilber-

Gasentladungslampe (*HBO 500, Oriol*) bzw. einer 500 W Hg(Xe)-Kurzbogenlampe mit Suprasilkolben (*Oriol*) ausgelöst. Die Lichtintensität wurde bei Bedarf mit einem 10 %-Transmissionsfilter (*100FN46-50*) begrenzt und einem Metallinterferenzfilter *334FS10-50* oder *365FS10-50* monochromatisiert (alle Filter von *Oriol*). Während der Bestrahlung wurden die Lösungen innerhalb der Küvetten mit einem kleinen Magnetrührer homogenisiert. Außerdem kam ein mit LEDs (330 nm – 12 mW, 360 nm – 18 mW, 405 nm – 310 mW und 435 nm – 720 mW) ausgerüstetes *LUMOS 43 (Atlas Photonics)* zum Einsatz.

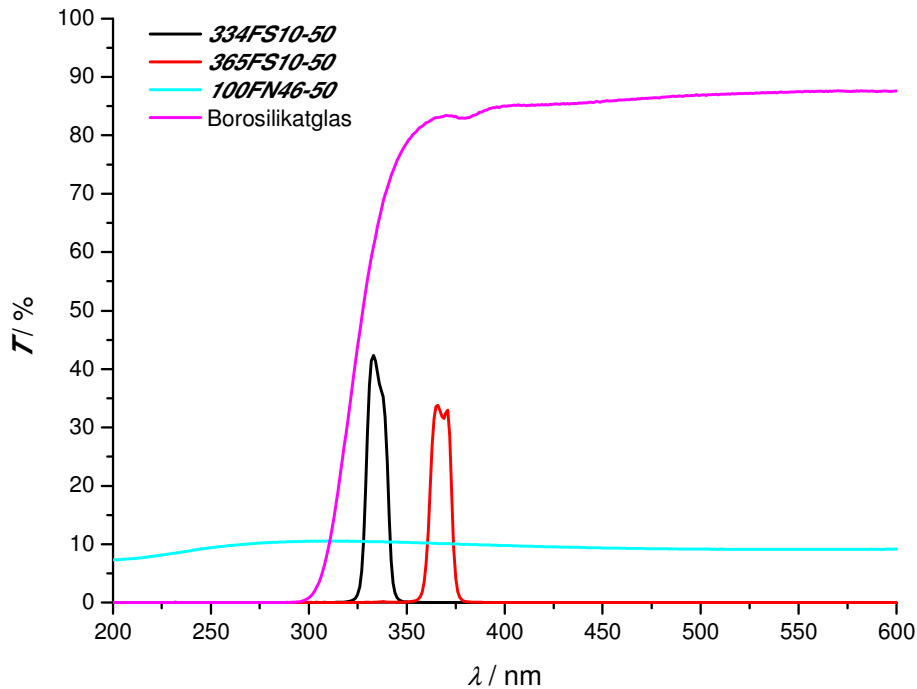


Abbildung 5-1: Transmissionsspektren der verwendeten Filter

Für die kinetischen Untersuchungen wurden die bestrahlten Lösungen in diskreten Zeitintervallen mittels analytischer HPLC charakterisiert. Die photochemischen Quantenausbeuten Φ_{chem} wurden durch Vergleich mit *E,E*-Diphenylbuta-1,3-dien in *n*-Hexan ($\Phi_{\text{chem}} = 0,11$)^{35c,50d} bzw. [(6,7-Dimethoxycumarin-4-yl)methyl]diethylphosphat in MeCN/HEPES-Pufferlösung (5/95) ($\Phi_{\text{chem}} = 0,08$)^{35c} als Referenzsubstanzen unter Anwendung von Gleichung 4 in Kapitel 3.2.3 ermittelt. Dabei wurden gleiche Reaktionsvolumina V_{R} von Probe und Standard bestrahlt.

Fluoreszenzquantenausbeute

Die Emissionsspektren der Lösungen der (Cumarin-4-yl)methyl-substituierten Verbindungen und der bei der Photolyse entstandenen (Cumarin-4-yl)methylalkohole [10 μM in MeCN/Pufferlösung (5/95)] wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: Anregungsspaltbreite 3 nm, Emissionsspaltbreite 3 nm, Aufnahmegeschwindigkeit 200 nm min^{-1} , Empfindlichkeit gering bzw. mittel, Auflösung 1,0. Die Korrekturfunktion $Q(\lambda)$, ermittelt durch Quotientenbildung nach Normierung von gemessenem und korrigiertem¹³⁰ Emissionsspektrum von Chininsulfat in 1 N H_2SO_4 , ist in Abbildung 5-2 b) dargestellt.

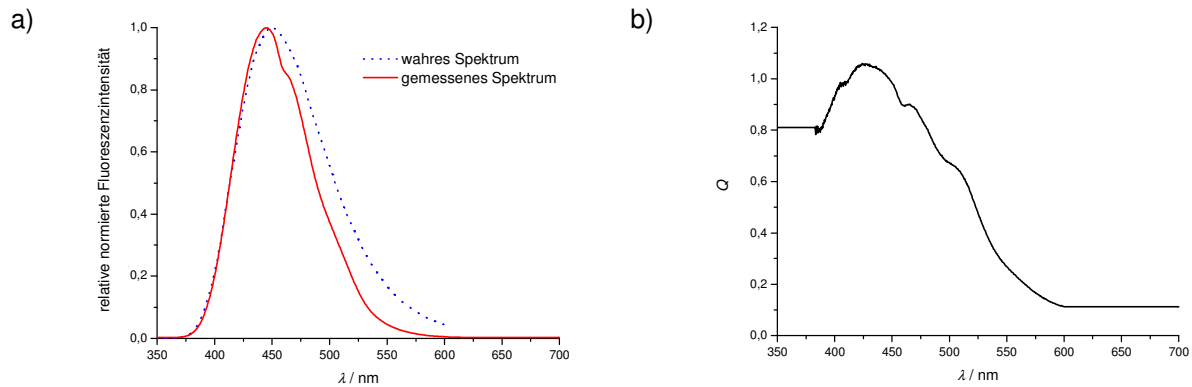


Abbildung 5-2: a) Wahres und gemessenes Emissionsspektrum von Chininhemisulfat-monohydrat in 1 N H₂SO₄ (normiert); b) Korrekturfunktion $Q(\lambda)$ für das verwendete Fluoreszenzspektrometer.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_{fl} wurden bei RT durch Vergleich korrigierter Spektren mit Chininhemisulfat-monohydrat (Chinin x 0,5 H₂SO₄ x H₂O) als Referenzsubstanz ($\Phi_{fl} = 0,546$ in 1 N H₂SO₄) nach der relativen Methode bestimmt (Gleichung 5 in Kapitel 3.2.4).¹³¹ Die Anregungswellenlängen wurden so gewählt, dass die Absorptionen der Lösungen des Standards und der untersuchten Substanz identisch waren. Die Brechungsindizes n der Lösungen wurden gemessen und bei der Berechnung von Φ_{fl} nach Gleichung 5 berücksichtigt.

2-Photonen-Photolyse

Die 2-Photonen-Photolyse erfolgte mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (*LSM 510 META NLO, Carl Zeiss Jena GmbH*), welches mit einem Titan-Saphir-Laser (Chameleon-Dioden-gepumpter Laser, *Coherent*, $\lambda_{exc} = 755$ nm) ausgestattet war.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der Photolysegeschwindigkeiten

Zeitaufgelöste Fluoreszenzanstiegs- und Fluoreszenzabklingkurven wurden im rechten Winkel zum Anregungslicht registriert.¹³² Als Anregungsenergiequelle diente ein *MSC 1600* Stickstofflaser von *LTB* ($\lambda_{exc} = 337$ nm, 0,5 ns Impulsbreite, 0,7 mJ maximale Impulsenergie), dessen Intensität durch Einbau diverser Transmissionsfilter in den Strahlengang abgeschwächt wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde durch eine Sammellinse gebündelt, passierte einen geeigneten Interferenzfilter ($\lambda_{em} = 488$ nm) und wurde von einer verstärkten AD 110 Silicium-Avalanche-Diode von *Opto-Electronics* (600 ps Anstiegszeit) detektiert. Alle Signale wurden digitalisiert und in einen *Tektronix TDS 620A* Speicheroszillographen eingespeist.

Zur Bestimmung der Apparatefunktion $AF(t)$ wurde eine MgO-Schicht im 45°-Winkel mit 20 Laserimpulsen bestrahlt und das gemittelte reflektierte Signal aufgezeichnet. $AF(t)$ beinhaltet die Verzerrung eines instantan abklingenden Signals, verursacht durch das endliche Laserimpulsprofil und die Ansprechzeit des Detektorsystems. Die Fluoreszenzsignale der entsprechenden (Cumarin-4-yl)methylalkohole wurden über 20 Laserimpulse gemittelt, während die *caged* Verbindungen nur mit jeweils einem Laserimpuls angeregt wurden. Die Fluoreszenzlebensdauer (τ_{fl}) der (Cumarin-4-

yl)methylalkohole wurden aus ihren Fluoreszenzabklingkurven durch nichtlineare Kurvenanpassung (Faltung von $AF(t)$ mit monoexponentieller Zerfallskinetik) ermittelt. Die erreichte Zeitauflösung betrug ca. 200 ps.

5.4 Allgemeine Synthesevorschriften

Methode A: Synthese der Aktivester mit Chlorameisensäure-4-nitro-phenylester

Zu dem in getrocknetem CH_2Cl_2 oder THF gelösten (Cumarin-4-yl)methylalkohol wurden 1,2-2,4 Äq. DIPEA, 1,2-2,4 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester und etwas Molsieb gegeben und anschließend wurde 0,5-5 h bei RT gerührt. Der entstandene Aktivester wurde zeitnah ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

Methode B: Synthese der Aktivesterverbindungen mit Di(N-succinimidyl)-carbonat

Zu dem in trockenem THF oder DMF gelösten (Cumarin-4-yl)methylalkohol wurden 5,5 Äq. Et_3N , 1,5 Äq. Di(N-succinimidyl)carbonat und etwas Molsieb gegeben und es wurde 5-12 h bei RT gerührt. Anschließend wurde THF im Vakuum entfernt und der entstandene Aktivester wurde zeitnah ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

Methode C: Umsetzung des nach Methode A hergestellten Aktivesters mit dem Biomolekül

Zu dem in trockenem CH_2Cl_2 bzw. DMF gelösten Aktivester des (Cumarin-4-yl)methylalkohols wurden 1,2 Äq. Biomolekül, 3 Äq. DIPEA bzw. 2,4 Äq. DMAP und etwas Molsieb gegeben und es wurde 1-12 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt gereinigt.

Methode D: Umsetzung des nach Methode B hergestellten Aktivesters mit dem Biomolekül

Zu dem in trockenem CH_2Cl_2 gelösten Aktivester des (Cumarin-4-yl)methylalkohols wurden 1 Äq. Biomolekül, 4 Äq. Et_3N und etwas Molsieb gegeben und es wurde 0,5-1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt gereinigt.

Methode E: Abspaltung der t-Bu-Schutzgruppen

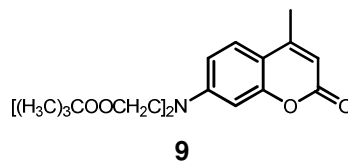
Die geschützte Verbindung wurde in 4 ml TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O (75/24/1) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde die entschützte Verbindung mittels präp. HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Methode F: Mannich-Reaktion mit BHCM-Verbindungen

In einem ausgeheizten und mit Schutzgas beschickten Kolben wurde 1 Äq. Paraformaldehyd (entspricht 3 Äq. CH₂O) in absolutem EtOH gelöst und mit 0,1 Äq. KOH versetzt. Die Reaktionslösung wurde solange auf 40 °C erhitzt bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach dem Kühlen der Reaktionslösung auf 0 °C wurden 3 Äq. der entsprechenden Amino- bzw. Iminoverbindung portionsweise zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde zu dem erhaltenen Mannichreagenz eine Lösung von 4,5 Äq. BHCM-OH in EtOH hinzugefügt und 1,5-48 h bei 80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch bzw. mittels präp. HPLC gereinigt und lyophilisiert.

5.5 Spezielle Synthesevorschriften

7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-methylcumarin^{33,35b}



Zu einer Suspension von 5,26 g (30 mmol) **8** in 90 ml MeCN wurden unter N₂ 15,51 g (120 mmol) DIPEA und 4,50 g (30 mmol) NaI hinzugefügt. Dabei bildete sich eine klare Lösung. Nach Zugabe von 39,01 g (200 mmol) Bromessigsäure-*tert*-butylester fiel ein hellgelber Niederschlag aus. Der Ansatz wurde 24 h unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und der Überschuß von Bromessigsäure-*tert*-butylester im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in AcOEt/gesätt. NaCl-Lösung (1/1) aufgenommen und zweimal mit gesätt. NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und mittels Flash-SC (*n*-Hexan/AcOEt = 5/1 bis 1/1) gereinigt. Es wurden 3,03 g (7,50 mmol, 25 %) **9** als hellgelber Feststoff isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 2,34 (s, 3H, Cum-CH₃), 4,18 (s, 4H, CH₂), 6,03 (s, 1H, H-3), 6,42 (d, ⁴J = 2,4, 1H, H-8), 6,57 (dd, ⁴J = 2,5, ³J = 9,0, 1H, H-6), 7,56 (d, ³J = 8,9, 1H, H-5).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 17,9 (CH₃), 27,7 (C(CH₃)₃), 53,5 (CH₂), 81,0 (C(CH₃)₃), 98,0 (C-8), 109,0 (C-4a), 109,1 (C-3), 110,0 (C-6), 126,0 (C-5), 151,2 (C-4), 153,5 (C-7), 154,9 (C-8a), 160,5 (C-2), 168,9 (OCOC(CH₃)₃).

Elementaranalyse C₂₂H₂₉NO₆: ber. C 65,49 %, H 7,24 %, N 3,47 %,
gef. C 65,25 %, H 7,28 %, N 3,25 %

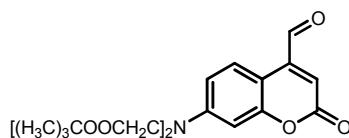
HRMS ber. 404,2073, gef. 404,2065 ([M+H]⁺)

Schmp. 151 °C

R_f (DC) 0,58 (*n*-Hexan/AcOEt = 3/2), 0,40 (*n*-Hexan/AcOEt = 2/1)

t_R (HPLC) 17,01 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-formylcumarin^{33,35b}



11

3,03 g (7,50 mmol) **10a** wurden in 120 ml trockenem *p*-Xylol in der Wärme gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1,66 g (15 mmol) gepulvertes Selendioxid gegeben und es wurde 6 h unter Rückfluß gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zum Entfernen des schwarzen Selens heiß filtriert und der Rückstand noch zweimal mit je 10 ml heißem *p*-Xylol gewaschen. Die tiefbraune Lösung wurde auf etwa 50 ml eingeeengt und über Nacht bei RT zur Kristallisation stehengelassen. Das Produkt wurde abgesaugt und mit wenig *p*-Xylol gewaschen. Aus der Mutterlauge konnte nach dem Einengen weiteres Produkt isoliert werden. Insgesamt wurden 2,45 g (5,87 mmol, 78 %) **11** als orangefarbener Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 4,21 (s, 4H, CH₂), 6,52 (d, ⁴J = 1,8, 1H, H-3), 6,65 (dd, ⁴J = 2,3, ³J = 9,2, 1H, H-6), 6,67 (s, 1H, H-8), 8,24 (d, ³J = 9,0, 1H, H-5), 10,09 (s, 1H, CHO).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (C(CH₃)₃), 53,4 (CH₂), 81,1 (C(CH₃)₃), 98,3 (C-3), 105,0 (C-4a), 109,8 (C-6), 118,0 (C-8), 126,4 (C-5), 143,7 (C-4), 151,5 (C-7), 156,1 (C-8a), 160,8 (C-2), 168,7 (OCOC(CH₃)₃), 193,9 (CHO).

Elementaranalyse C₂₂H₂₇NO₇·x0,5 H₂O (426,47): ber. C 61,96 %, H 6,62 %, N 3,28 %, gef. C 62,02 %, H 6,54 %, N 3,26 %

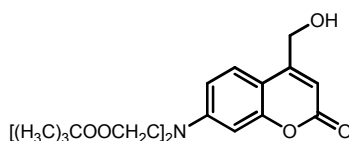
HRMS ber. 418,1866, gef. 418,1857 ([M+H]⁺)

Schmp. 156 °C

R_f (DC) 0,29 (*n*-Hexan/AcOEt = 2/1)

t_R (HPLC) 16,89 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-(hydroxymethyl)cumarin^{33,35b}



12

Zu einer Suspension von 1,74 g (4,17 mmol) **11** in 30 ml MeOH wurden 0,16 g (4,17 mmol) NaBH₄ gegeben. Die entstandene Lösung wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend mit 50 ml Wasser versetzt, mit 1 M HCl-Lösung auf pH 5 eingestellt und dreimal mit je 40 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 30 ml gesätt. NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und mittels Flash-SC (*n*-Hexan/AcOEt = 2/1 bis AcOEt) gereinigt. Es resultierten 1,05 g (2,50 mmol, 60 %) **12** als hellgelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 4,18 (s, 4H, CH₂), 4,68 (d, ³J = 5,1, 2H, CH₂OH), 5,52 (t, ³J = 5,6, 1H, OH), 6,15 (s, 1H, H-3), 6,44 (d, ⁴J = 2,4, 1H, H-8), 6,54 (dd, ⁴J = 2,4, ³J = 9,0, 1H, H-6), 7,49 (d, ³J = 9,0, 1H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 27,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 53,5 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2$), 59,0 (CH_2OH), 81,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 98,1 (C-8), 105,4 (C-4a), 107,4 (C-6), 108,9 (C-3), 124,9 (C-5), 151,1 (C-4), 154,9 (C-7), 156,8 (C-8a), 160,8 (C-2), 168,9 ($\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$).

Elementaranalyse $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_7$: ber. C 62,99 %, H 6,97 %, N 3,34 %,
gef. C 63,22 %, H 7,00 %, N 3,29 %

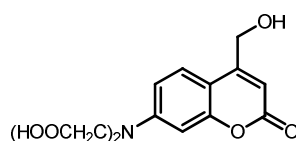
HRMS ber. 420,2017, gef. 420,2018 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 152-155 °C (Zers.)

R_f (DC) 0,29 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 13,88 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

7-[Bis(carboxymethyl)amino]-4-(hydroxymethyl)cumarin^{33,35b}



13

83,7 mg (0,20 mmol) **12** wurden nach Methode E umgesetzt. Die Reinigung mittels präp. HPLC (5–95 % B in A, 0–60 min, RP 100-10, t_R = 24,7 min) ergab 55,4 mg (0,18 mmol, 90 %) **13** als hellgelben Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 4,21 (s, 4H, NCH_2), 4,68 (s, 2H, CH_2), 5,49 (bs, 1H, OH), 6,14 (s, 1H, H-3), 6,45 (d, 4J = 1,9, 1H, H-8), 6,56 (dd, 3J = 8,9, 4J = 1,9, 1H, H-6), 7,48 (d, 3J = 8,9, 1H, H-5), 12,77 (bs, 2H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 52,8 (NCH_2), 59,0 (CH_2), 97,9 (C-8), 105,2 (C-3), 107,3 (C-4a), 108,9 (C-6), 124,9 (C-5), 151,1 (C-8), 154,9 (C-8a), 156,8 (C-4), 160,8 (C-2), 171,4 (COOH).

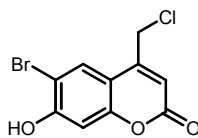
HRMS ber. 308,0770, gef. 308,0764 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 185 °C

R_f (DC) 0,29 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 7,66 min (5–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

6-Brom-4-chlormethyl-7-hydroxycumarin^{34,36b}



15

Eine Suspension aus 10,0 g (52,9 mmol) 4-Bromresorcinol, 10,8 ml (13,1 g, 79,4 mmol) 4-Chloracetessigsäureethylester und 80 ml Methansulfonsäure wurde 2 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde anschließend auf Eiswasser gegossen und weitere 2 h gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit 60 ml kaltem Wasser gewaschen. Es wurden 13,8 g (47,9 mmol, 91 %) **15** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 4,99 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,47 (s, 1H, CumH-3), 6,92 (s, 1H, CumH-8), 7,99 (s, 1H, CumH-5), 11,53 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 41,2 (Cum-CH₂), 103,3 (CumC-8), 106,1 (CumC-6), 110,7 (CumC-4a), 112,1 (CumC-3), 129,0 (CumC-5), 150,1 (CumC-4), 154,0 (CumC-8a), 157,5 (CumC-7), 159,6 (CumC-2).

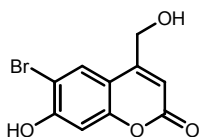
HRMS ber. 288,9262; gef. 288,9259 ([M+H]⁺)

Schmp. 159 °C

R_f (DC) 0,47 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1 unter Zusatz von 1 % AcOH)

t_R (HPLC) 9,22 min (30–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

6-Brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin^{34,133}



16

13,30 g (45,94 mmol) **15** wurden in 100 ml H₂O/DMF (1/1) gelöst und 12 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand mittels Flash-SC (*n*-Hexan/AcOEt = 3/1 bis 1/1 unter Zusatz von 0,1 % AcOH) gereinigt. Es resultierten 8,22 g (30,31 mmol, 66 %) **16** als hellgelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 4,69 (s, 2H, Cum-CH₂), 5,60 (s, 1H, CH₂OH), 6,27 (s, 1H, CumH-3), 6,89 (s, 1H, CumH-8), 7,83 (s, 1H, CumH-5), 11,37 (s, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 59,1 (Cum-CH₂), 103,1 (CumC-8), 106,0 (CumC-6), 107,7 (CumC-3), 111,0 (CumC-4a), 128,2 (CumC-5), 153,7 (CumC-4), 156,0 (CumC-7), 157,1 (CumC-8a), 160,1 (CumC-2).

HRMS ber. 270,9600; gef. 270,9602 ([M+H]⁺)

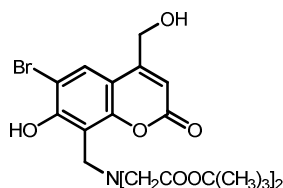
Schmp. >224 °C (Zers.)

R_f (DC) 0,17 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 4,70 min (30–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

6,05 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin^{36b}



17

4,91 g (20 mmol) Iminodiessigsäure-di-*tert*-butylester (**20**) und 4,34 g (16 mmol) **16** wurden nach Methode F innerhalb von 2 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-SC (*n*-Hexan/AcOEt = 9/1 bis 3/1) wurden 5,50 g (10,4 mmol, 65 %) **17** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 3,46 (s, 4H, NCH₂CO), 4,16 (s, 2H, CH₂NCH₂CO), 4,70 (s, 2H, Cum-CH₂OH), 5,61 (s, 1H, Cum-CH₂OH), 6,28 (s, 1H, CumH-3), 7,83 (s, 1H, CumH-5), 11,74 (s, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (C(CH₃)₃), 47,8 (Ph-CH₂N), 54,6 (NCH₂CO), 59,1 (Cum-CH₂OH), 81,4 (C(CH₃)₃), 105,9 (CumC-6), 107,6 (CumC-3), 110,0 (CumC-4a), 110,8 (CumC-8), 127,0 (CumC-5), 151,5 (CumC-4), 156,2 (CumC-7), 156,9 (CumC-8a), 159,6 (CumC-2), 169,8 (OCOC(CH₃)₃).

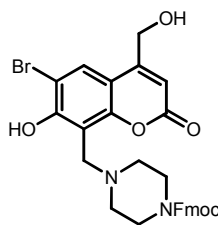
HRMS ber. 528,1228; gef. 528,1236 ([M+H]⁺)

Schmp. 159 °C

R_f (DC) 0,49 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 16,58 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

6-Brom-8-{{4-[(fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]-piperazin-1-yl)methyl}-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin



18

516,84 mg (6 mmol) Piperazin und 813,2 mg (3 mmol) **16** wurden nach Methode F innerhalb von 12 h umgesetzt. Beim Erkalten der Reaktionslösung fielen 0,86 g (2,33 mmol) des **PBHCM-OH (25)** als Feststoff aus. Dieser wurde mit 603 mg (2,33 mmol) FmocCl und 513 μ l (3 mmol) DIPEA in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst, 5 h bei 40 °C und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde die erhaltene Reaktionslösung dreimal mit 5%ig. KHSO₄-Lsg. ausgeschüttelt und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer wurde das Produkt mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 100/1 bis 24/1) gereinigt. Es wurden 200 mg (0,34 mmol, 11 %) **18** als hellgelber Feststoff erhalten.

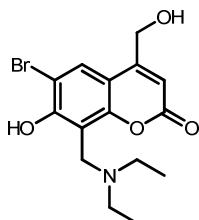
¹H-NMR (300 MHz, 300 K, d₆-DMSO): δ 2,53 (bs, 4H, NCH₂CH₂N), 3,42 (bs, 4H, NCH₂CH₂N), 4,04 (s, 2H, Cum-CH₂N), 4,28 (t, ³J = 6,2, 1H, FluH-1), 4,41 (d, ³J = 6,3, 2H, FluCH₂), 4,70 (s, 2H, Cum-CH₂OH), 5,75 (s, 1H, Cum-CH₂OH), 6,28 (s, 1H, CumH-3), 7,32-7,45 (m, 4H, FluH-3, FluH-4, FluH-7, FluH-8), 7,63 (d, ³J = 7,2, 2H, FluH-2, FluH-9), 7,81 (s, 1H, CumH-5), 7,89 (d, ³J = 7,3, 2H, FluH-5, FluH-6).

¹³C-NMR (75,5 MHz, 300 K, d₆-DMSO): δ 41,5 (NCH₂CH₂N), 46,8 (FluC-1), 50,6 (NCH₂CH₂N), 51,1 (Cum-CH₂N), 59,2 (Cum-CH₂OH), 66,9 (FluCH₂), 106,8 (CumC-6), 107,4 (CumC-3), 107,9 (CumC-8), 111,1 (CumC-4a), 120,2 (2C, FluC-5, FluC-6), 125,1 (2C, FluC-2, FluC-9), 127,2 [2C, (FluC-3, FluC-8)/(FluC-4, FluC-7)], 127,7 [2C, (FluC-3, FluC-8)/(FluC-4, FluC-7)], 128,5 (CumC-5), 140,8 (2C, FluC-5a, FluC-5b), 143,7 (2C, FluC-1a, FluC-9a), 152,3 (CumC-7/CumC-8a), 154,1 (NCOO), 156,2 (CumC-4), 157,3 (CumC-7/CumC-8a), 159,6 (CumC-2).

HRMS ber. 591,1125; gef. 591,1133 ([M+H]⁺)

| | |
|----------------------------|--|
| Schmp. | 121 °C |
| R_f(DC) | 0,59 (CHCl ₃ /MeOH = 9/1) |
| t_R(HPLC) | 12,28 min (5–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) |

[6-Brom-8-(diethylaminomethyl)-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)]cumarin



19

2,08 ml (20 mmol) Et₂NH und 1,06 g (3,89 mmol) **16** wurden nach Methode F innerhalb von 3 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1) wurden 313,4 mg (0,88 mmol, 23 %) **19** als orangefarbener Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,18 (t, ³J = 7,1, 6H, CH₂CH₃), 2,93 (q, ³J = 7,2, 4H, CH₂CH₃), 4,21 (s, 2H, Cum-CH₂N), 4,63 (s, 2H, Cum-CH₂OH), 6,03 (s, 1H, CumH-3), 7,67 (s, 1H, CumH-5)

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 9,6 (CH₃), 46,2 (CH₂CH₃), 48,9 (Cum-CH₂N), 59,2 (Cum-CH₂OH), 103,1 (CumC-3), 105,4 (CumC-4a), 105,5 (CumC-8), 109,7 (CumC-6), 126,3 (CumC-5), 152,6 (CumC-4), 156,7 (CumC-7/CumC-8a), 160,5 (Cum-C-2), 165,2 (CumC-7/CumC-8a).

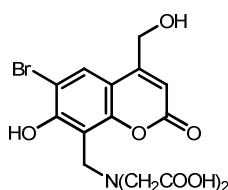
HRMS ber. 356,0492, gef. 356,0498 ([M+H]⁺)

Schmp. 78 °C

R_f(DC) 0,54 (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), 0,37 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R(HPLC) 5,09 min (5–95 % B in A, 0-20 min, RP-Amid Säule)

8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-cumarin



23

38,8 mg (73,4 μmol) **17** wurden in 2 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und nach Zugabe von 6 ml TFA und 100 μl Wasser wurde 60 min bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde zur Trockne eingeeengt und Reste von TFA durch Kodestillation mit Et₂O am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (5–50 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 28,4 min) resultierten 14,0 mg (33,6 μmol, 46 %) **23** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,51 (s, 4 H, NCH₂CO), 4,19 (s, 2H, Cum-CH₂N), 4,69 (s, 2H, Cum-CH₂OH), 6,28 (s, 1H, CumH-3), 7,82 (s, 1H, CumH-5).

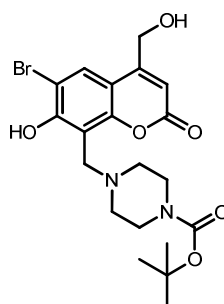
$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 47,9 (Cum- CH_2N), 53,5 (N CH_2CO), 59,1 (Cum- CH_2OH), 105,9 (CumC-6), 107,6 (CumC-3), 110,0 (CumC-4a), 110,7 (CumC-8), 126,9 (CumC-5), 151,6 (CumC-7/CumC-8a), 156,2 (CumC-4), 157,1 (CumC-7/CumC-8a), 159,7 (CumC-2), 172,2 (COOH).

HRMS ber. 415,9976, gef. 415,9977 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 219 °C (Zers.)

t_R (HPLC) 8,93 min (5–50 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

6-Brom-8- $\{[4-(tert\text{-butoxycarbonyl})\text{-}(\text{piperazin-1-yl})\text{]methyl}\}$ -7-hydroxy-4-(hydroxymethyl)cumarin



26

186,3 mg (1 mmol) 1-Boc-piperazin wurden nach Methode F in das entsprechende Mannichreagenz überführt und dann mit 135,5 mg (0,5 mmol) **16** durch 18 h Rühren bei 80 °C umgesetzt. EtOH wurde entfernt, der Rückstand in AcOEt gelöst und dreimal mit dest. H_2O gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Lyophilisierung wurden 209 mg (0,45 mmol, 89 %) **26** als orangefarbener Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 260 K, CDCl_3): δ 1,44 (s, 9H, CH_3), 2,97 (bs, 2H, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,29 (t, $^3J = 11,5$, 1H, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,39-3,43 (m, 2H, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,47 (d, $^3J = 10,1$, 1H, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,09 (d, $^3J = 12,2$, 1H, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,23 (d, $^3J = 13,2$, 1H, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,46 (s, 2H, Cum- CH_2N), 4,82 (s, 2H, Cum- CH_2OH), 6,50 (s, 1H, CumH-3), 7,74 (s, 1H, CumH-5).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 295 K, d_6 -DMSO): δ 1,41 (s, 9H, CH_3), 3,12 (bs, 4H, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,53 (bs, 4H, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,38 (s, 2H, Cum- CH_2N), 4,72 (s, 2H, Cum- CH_2OH), 6,34 (s, 1H, CumH-3), 7,96 (s, 1H, CumH-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, 270 K, CDCl_3): δ 28,2 (CH_3), 39,5 (2C, N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 40,7 (N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 50,4 (Cum- CH_2N), 52,3 (N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 60,4 (Cum- CH_2OH), 81,57 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 107,0 (CumC-8), 109,5 (CumC-3), 110,2 (CumC-6), 111,9 (CumC-4a), 129,1 (CumC-5), 152,3 (CumC-4/CumC-7/CumC-8a), 153,5 (CumC-4/CumC-7/CumC-8a), 154,2 (NOCO), 157,1 (CumC-4/CumC-7/CumC-8a), 159,9 (CumC-2).

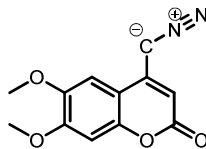
$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, 296,2 K, d_6 -DMSO): δ 28,0 (CH_3), 50,0 (Cum- CH_2N), 51,3 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{Piperazin})$), 59,1 (Cum- CH_2OH), 79,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 107,0 (CumC-8, CumC-6), 108,0 (CumC-3), 111,2 (CumC-4a), 128,8 (CumC-5), 152,5 (CumC-7/CumC-8a), 153,3 (NCOO), 156,2 (CumC-4), 157,1 (CumC-7/CumC-8a), 159,5 (CumC-2).

HRMS ber. 469,0969, gef. 469,0987 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 99 °C

| | |
|-----------------------------|--|
| R_f (DC) | 0,41 (CHCl ₃ /MeOH = 19/1), 0,29 (<i>n</i> -Hexan/AcOEt = 1/1) |
| t_R (HPLC) | 6,20 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) 13,69 min (5–50 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) |

4-Diazomethyl-6,7-dimethoxycumarin (DMCM-N₂)



27

4,43 g (11,0 mmol) **30** und 1,53 ml (11,0 mmol) Et₃N wurden in 50 ml MeOH gegeben und 2,5 h bei RT gerührt. Das Produkt fiel als gelber Niederschlag aus. Der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und einmal mit MeOH und einmal mit Et₂O gewaschen. Es resultierten 2,12 g (8,61 mmol, 78 %) **27** als gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 5,69 (s, 1H, CHN₂), 6,65 (s, 1H, CumH-3), 6,99 (s, 1H, CumH-8), 7,10 (s, 1H, CumH-5).

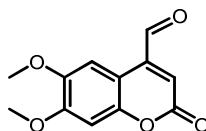
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 45,6 (C-3), 56,1 (OCH₃), 56,3 (OCH₃), 97,0 (CHN₂), 100,3 (C-8), 105,0 (C-5), 108,0 (C-4a), 145,71 (C-6/C-7), 147,2 (C-4), 148,6 (C-8a), 152,9 (C-6/C-7), 159,9 (C-2).

ESI-MS ber. 248,07, gef. 248,07 ([M+H]⁺)

Schmp. >250 °C (Zers.)

t_R (HPLC) 5,86 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

6,7-Dimethoxy-4-formylcumarin



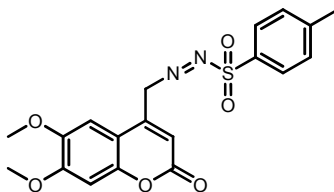
29

4,40 g (20,0 mmol) 6,7-Dimethoxy-4-methylcumarin (**28**) wurden in 280 ml Xylol gegeben und so lange erwärmt bis eine klare Lösung entstand. 3,33 g (30,0 mmol) gepulvertes SeO₂ wurden zur heißen Lösung zugegeben und es wurde 7 h bei 150 °C gerührt. Das SeO₂ wurde heiß abfiltriert. Beim Erkalten der Lösung fiel das Produkt als gelber Niederschlag aus. Der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und zweimal mit Et₂O gewaschen. Es resultierten 4,64 g (19,8 mmol, 99 %) **29** als gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 6,98 (s, 1H, CumH-3), 7,16 (s, 1H, CumH-8), 7,94 (s, 1H, CumH-5), 10,14 (s, 1H, CHO).

ESI-MS ber. 234,05, gef. 234,06 ([M+H]⁺)

Schmp. 190-193 °C

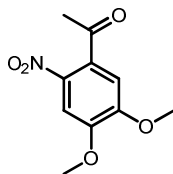
6,7-Dimethoxy-4-[(*p*-toluensulfonyl)hydrazonmethyl]cumarin**30**

3,98 g (17,0 mmol) **29** und 3,17 g (17,0 mmol) *p*-Toluensulfonylhydrazin in 50 ml EtOH gegeben und 5 h bei RT gerührt. Das Produkt fiel als gelber Niederschlag aus. Der erhaltene Niederschlag wurde gefiltert und einmal mit EtOH und einmal mit Et₂O gewaschen. Es resultierten 3,11 g (7,72 mmol, 45 %) **30** als gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,36 (s, 3H, CH₃), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 6,50 (s, 1H, CHN), 70,8 (s, 1H, CumH-3), 7,43 (d, ³J = 12,2, 2H, PhH-3, PhH-4), 7,76 (d, ³J = 12,2, 2H, PhH-2, PhH-6), 8,02 (s, 1H, CumH-8), 8,13 (s, 1H, CumH-5).

ESI-MS ber. 401,1, gef. 401,2 ([M-H]⁺)

Schmp. 150-159 °C

1-Acetyl-4,5-dimethoxy-2-nitrobenzol**33**

5,00 g (27,75 mmol) 3,4-Dimethoxyacetophenon wurden in 50 ml TFA gelöst, im Eisbad auf 0 °C gekühlt und langsam mit einer Lösung von 4,21 g (41,62 mmol) KNO₃ in 50 ml TFA versetzt. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung 3 h bei RT gerührt. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer wurden 300 ml Eiswasser auf die Reaktionsmischung gegossen und es wurde 30 min gerührt. Der ausgefallene farblose Niederschlag wurde abgesaugt und mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 1/0 bis 100/1) gereinigt. Nach der Lyophilisierung wurden 5,34 g (23,71 mmol, 86 %) **33** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,52 (s, 3H, CH₃), 3,90 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,93 (s, 3H, 5-OCH₃), 7,22 (s, 1H, H-6), 7,63 (s, 1H, H-3).

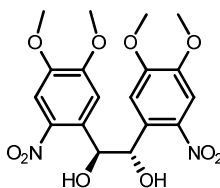
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 30,0 (CH₃), 56,3 (4-OCH₃), 56,6 (5-OCH₃), 107,1 (C-3), 109,7 (C-6), 131,1 (C-1), 138,4 (C-2), 149,4 (C-4), 153,1 (C-5), 199,2 (CO).

HRMS ber. 226,0710, gef. 226,0709 ([M+H]⁺)

Schmp. 134 °C

R_f (DC) 0,52 (CH₂Cl₂)

t_R (HPLC) 9,79 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

(1*S*,2*S*)-1,2-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1,2-diol^{18b}**35**

1,11 g (2,84 mmol) des *trans*-/*cis*-Gemischs aus **39a** und **39b** wurden in 20 ml CH₂Cl₂ und 6 ml H₂O gelöst und mit 0,50 g (3,69 mmol) NMO in 6 ml H₂O sowie 0,04 g (0,14 mmol) OsO₄ (4%ig. Lösung in H₂O) versetzt. Nach 24 h Rühren wurden 3,9 g Na₂S₂O₄ in 33 ml H₂O hinzugegeben und es wurde weitere 24 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 200 ml AcOEt gelöst und in 100 ml H₂O gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 100 ml AcOEt gewaschen. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und mittels Flash-SC gereinigt (Toluol/AcOEt = 9/1). Es wurden 130 mg (0,31 mmol, 8 %) **35** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,61 (s, 6H, OCH₃), 3,79 (s, 7H, OCH₃), 5,57 (d, ⁴J = 3,6, 2H, CHOH), 5,90 (d, ⁴J = 3,6, 2H, OH), 6,70 (s, 2H, H-6), 7,36 (s, 2H, H-3).

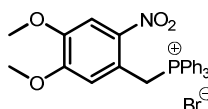
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 55,5 (OCH₃), 56,0 (OCH₃), 70,1 (2C, CHOH), 107,3 (C-3), 110,9 (C-6), 129,6 (C-1), 141,2 (C-2), 147,2 (C-4), 151,3 (C-5).

ESI-MS ber. 426,1, gef. 426,1 ([M+2H]²⁺)

Schmp. 154-157 °C

R_f (DC) 0,11 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 3,79 min (50–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)triphenylphosphoniumbromid**37**

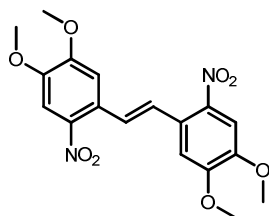
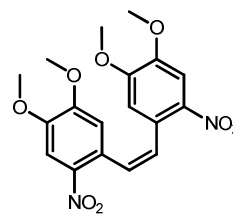
5,62 g (20,34 mmol) 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylbromid (**36**) und 5,33 g (20,34 mmol) PPh₃ wurden in 120 ml Toluol gelöst und 12 h unter Rückfluss gerührt. Das Produkt fiel bei der Reaktion als hellbrauner Niederschlag aus. Der erhaltene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Toluol gewaschen und getrocknet. Es wurden 10,52 g (19,58 mmol, 96 %) **37** als hellbrauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,53 (s, 3H, 5-OCH₃), 3,85 (s, 3H, 4-OCH₃), 5,41 (d, ²J(H-P) = 15,0, 2H, CH₂), 6,81 (s, ⁴J(H-P) = 1,7, 1H, H-6), 7,58 (s, 1H, H-3), 7,60-7,67 (m, 6H, PhH-2/6), 7,74 (m, 6H, PhH-3/5), 7,92 (t, ⁴J = 7,2, 3H, PhH-4).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,3 (d, ¹J(C-P) = 49,4, CH₂), 56,1 (OCH₃), 56,2 (OCH₃), 108,8 (C-3), 115,0 (d, ³J(C-P) = 4,9, C-6), 117,2 (d, ¹J(C-P) = 85,2, C-1), 117,4 (d, ²J(C-P) = 8,8, C-1), 130,2 (d, ³J(C-P) = 12,4, 2C, PhC-3/5), 134,0 (d, ²J(C-P) = 9,9, 2C, PhC-2/6), 135,3 (PhC-4), 141,1 (d, ¹J(C-P) = 5,9, C-2), 148,8 (d, ⁵J(C-P) = 2,7, C-4), 152,9 (d, ⁴J(C-P) = 3,1, C-5).

| | |
|--------------------------------|---|
| HRMS | ber. 458,1516, gef. 458,1503 ($[M+H]^+$) |
| Schmp. | 210 °C |
| t_R (HPLC) | 13,42 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) |

***trans*-1,2-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethen (39a) und *cis*-1,2-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethen (39b)^{18a}**

**39a****39b**

10,52 g (20 mmol) **37** wurden in 160 ml MeOH gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 1,09 g (20 mmol) NaOMe in 40 ml MeOH langsam hinzugegeben und die Reaktionsmischung 10 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 4,13 g (20 mmol) **38** in 300 ml MeOH langsam hinzugefügt und die Reaktionsmischung wurde 4 h bei RT gerührt. Das erhaltene Stilbengemisch fiel als hellbrauner Niederschlag aus, welcher abgesaugt, mit MeOH gespült und getrocknet wurde. Nach Lyophilisierung wurden 2,90 g (7,43 mmol, 44 %) eines gelben Produktgemisches der *trans*-/*cis*-Isomere **39a** und **39b** im Verhältnis 1 zu 4 erhalten.

Für die analytische Charakterisierung der einzelnen Isomere wurden 100 mg des Produktgemisches mittels präp. HPLC (50–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec) getrennt. **39b** wurde bei $t_R = 17,77$ min und **39a** bei $t_R = 20,05$ min erhalten.

Zur Isomerisierung vom *cis*-Stilben (**39b**) zum *trans*-Stilben (**39a**) wie von BESTMANN 1969 beschrieben,¹¹³ wurden 59,6 mg (0,15 mmol) des Stilben-Gemisches in 10 ml AcOH gelöst und mit 7 ml 33%ig. HBr in AcOH versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei 120 °C unter Rückfluss gerührt. Nach kurzem Abkühlen wurde die Reaktionslösung auf Eiswasser gegossen und über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit AcOH und Wasser gewaschen. Die Reinigung mittels präp. HPLC (50–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec) und die anschließende Lyophilisierung ergaben 20,6 mg (0,05 mmol, 35 %) reines **39a** als farblosen Feststoff.

39a

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,90 (s, 6H, OCH₃), 3,96 (s, 6H, OCH₃), 7,29 (s, 2H, H-6), 7,55 (s, 2H, CH=CH), 7,64 (s, 2H, H-3).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 56,1 (OCH₃), 56,3 (OCH₃), 107,8 (C-3), 110,1 (C-6), 126,9 (C-1), 127,8 (2C, CH=CH), 140,3 (C-2), 148,4 (C-4), 153,0 (C-5).

| | |
|--------------------------------|---|
| HRMS | ber. 391,1136, gef. 391,0927 ($[M+H]^+$) |
| Schmp. | 244-247 °C |
| R_f (DC) | 0,70 (<i>n</i> -Hexan/AcOEt = 1/1) |
| t_R (HPLC) | 10,00 min (50–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) |
| | 15,47 min (5–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) |

39b

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,48 (s, 6H, OCH₃), 3,84 (s, 6H, OCH₃), 6,46 (s, 2H, H-6), 7,08 (s, 2H, CH=CH), 7,64 (s, 2H, H-3).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 55,8 (OCH₃), 56,1 (OCH₃), 107,6 (C-3), 113,1 (C-6), 126,4 (C-1), 128,5 (2C, CH=CH), 140,3 (C-2), 147,8 (C-4), 152,4 (C-5).

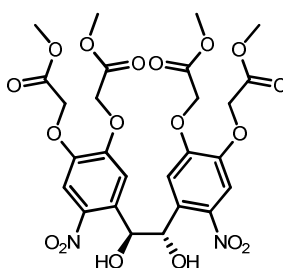
HRMS ber. 391,1136, gef. 391,0927 ([M+H]⁺)

Schmp. 231-233 °C

R_f (DC) 0,63 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 8,71 min (50–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

14,31 min (5–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

(1*S*,2*S*)-1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethan-1,2-diol**40**

a) 5,08 g (8,16 mmol) des *trans*-/*cis*-Gemisches aus **47a** und **47b**, das 1,44 g (2,31 mmol) **47a** enthielt, 1,43 g (10,61 mmol) NMO sowie 99,7 µl (0,41 mmol) OsO₄ wurden in 150 ml CH₂Cl₂/H₂O (2/1) gelöst und 72 h kräftig bei RT gerührt. Anschließend wurden 1,70 g (9,76 mmol) Na₂S₂O₄ in 50 ml H₂O gelöst, zum Reaktionsgemisch hinzugefügt und es wurde 24 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 ml CH₂Cl₂ und 50 ml H₂O versetzt und im Schütteltrichter getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingeeengt und mittels Flash-SC (CHCl₃/AcOEt = 9/1 bis 8/1) gereinigt. Es wurden 289,4 mg [0,44 mmol, 5,4 % (19,1 % bezogen auf **47a**)] **40** als gelber Feststoff isoliert.

b) 24,9 mg (0,04 mmol) des *trans*-Stilbens **47a**, 5,46 mg (0,04 mmol) NMO sowie 0,4 µl (0,002 mmol) 4%ig. OsO₄-Lsg. in H₂O wurden in 3 ml CH₂Cl₂/H₂O (2/1) gelöst und 48 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 40 mg (0,16 mmol) Na₂S₂O₄·5 H₂O in 300 µl H₂O hinzugefügt und es wurde weitere 24 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10 ml CH₂Cl₂ und 10 ml H₂O versetzt und im Schütteltrichter getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel getrennt, der Rückstand in MeCN/H₂O (1/1) gelöst und mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-60 min, 9,2 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 29,18 min) gereinigt. Es resultierten 25,4 mg (0,04 mmol, 96 %) **40** als gelber Feststoff.

¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): δ 3,70 (s, 6H, OCH₃), 3,71 (s, 6H, OCH₃), 4,64 (d, ²J = 16,2, 2H, CH₂), 4,75 (d, ²J = 16,2, 2H, CH₂), 4,92 (s, 4H, 4-OCH₂), 5,41 (d, ²J = 4,2, 2H, CH-OH), 5,84 (d, ²J = 4,8, 2H, CH-OH), 6,76 (s, 2H, H-6), 7,42 (s, 2H, H-3).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 51,9 (OCH₃), 52,0 (OCH₃), 65,4 (CH₂), 65,5 (CH₂), 109,7 (C-3), 113,4 (C-6), 130,6 (C-1), 141,7 (C-2), 145,6 (C-4), 149,7 (C-5), 168,3 (5-OCH₂CO₂), 168,7 (4-OCH₂CO₂).

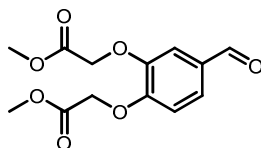
HRMS ber. 657,1410, gef. 657,1411 ([M+H]⁺)

Schmp. 129 °C

R_f (DC) 0,45 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 13,31 min (5–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

3,4-Bis(methoxycarbonylmethoxy)benzaldehyd



42

25,05 g (181,4 mmol) käufliches **41** wurden in 140 ml DMF gelöst und mit 62,67 g (453,4 mmol) K₂CO₃ versetzt. Die entstandene Suspension wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden unter Rühren 41,68 ml (453,41 mmol) Bromessigsäuremethylester langsam zugegeben und die Reaktionsmischung 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 50 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und mit 50 ml dest. H₂O ausgeschüttelt. Anschließend wurde die wässrige Phase zweimal mit CH₂Cl₂ gewaschen. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ und dem Einengen am Rotationsverdampfer wurden 35,61 g (126,2 mmol, 70 %) **42** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,71 (s, 6H, OCH₃), 4,93 (s, 2H, CH₂), 4,98 (s, 2H, CH₂), 7,14 (d, ³J = 8,4, 1H, H-5), 7,38 (s, 1H, H-2), 7,55 (d, ³J = 8,4, 1H, H-6), 9,83 (s, 1H, CHO).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 51,9 (OCH₃), 52,0 (OCH₃), 65,1 (CH₂), 65,2 (CH₂), 112,4 (C-2), 113,3 (C-6), 126,0 (C-5), 130,2 (C-1), 147,4 (C-3), 152,4 (C-4), 168,6 (COOCH₃), 169,0 (COOCH₃), 191,3 (CHO).

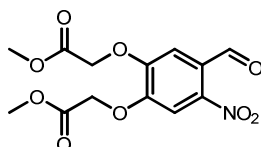
HRMS ber. 305,0632, gef. 305,0613 ([M+Na]⁺)

Schmp. 96 °C

R_f (DC) 0,36 (THF/*n*-Hexan = 1/1)

t_R (HPLC) 13,50 min (5–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd



43

35,40 g (125,43 mmol) **42** wurden in 100 ml TFA gelöst. Die erhaltene Lösung wurde im Eisbad auf -5 bis 0 °C gekühlt und langsam mit 15,21 g (150,5 mmol) KNO₃ in 100 ml TFA versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 13 h bei RT gerührt. Nach Entfernen von TFA im Hochvakuum wurde

Eiswasser auf den Rückstand gegossen und es wurde 30 min nachgerührt. Der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet. Es wurden 41,17 g (125,43 mmol, 100 %) **43** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO): δ 3,72 (s, 3H, OCH₃), 3,72 (s, 3H, OCH₃), 5,11 (s, 2H, CH₂), 5,12 (s, 2H, CH₂), 7,36 (s, 1H, H-6), 7,75 (s, 1H, H-3), 10,15 (s, 1H, CHO).

¹³C-NMR (75,5 MHz, *d*₆-DMSO): δ 52,1 (OCH₃), 65,4 (CH₂), 65,6 (CH₂), 109,6 (C-3), 112,4 (C-6), 125,0 (C-1), 143,8 (C-2), 150,2 (C-5), 150,8 (C-4), 168,3 (COOCH₃), 168,4 (COOCH₃), 188,4 (CHO).

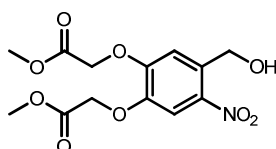
HRMS ber. 328,0669, gef. 328,0668 ([M+H]⁺)

Schmp. 129 °C

R_f (DC) 0,43 (THF/*n*-Hexan = 1/1)

t_R (HPLC) 13,12 min (5–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol



44

10,47 g (32,00 mmol) **43** wurden in 410 ml CH₂Cl₂/MeOH/AcOH (35/5/1) gelöst und im Eisbad auf -5 bis 0 °C gekühlt. 2,42 (64 mmol) NaBH₄ wurden portionsweise so hinzugefügt, dass der pH-Wert nie über 8 anstieg, wobei insgesamt 90 min gerührt wurde. Nach Zugabe von 5 ml 1 N HCl und 50 ml CH₂Cl₂ wurde das Gemisch dreimal mit 50 ml gesätt. NaCl-Lsg. gewaschen, die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach der Reinigung mittels Flash-SC (AcOEt/*n*-Hexan = 1/3 bis 2/3) wurden 5,03 g (15,27 mmol, 44 %) **44** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, *d*₆-DMSO): δ 3,72 (s, 3H, OCH₃), 3,72 (s, 3H, OCH₃), 4,78 (s, 2H, CH₂OH), 4,97 (s, 2H, 5-OCH₂), 5,00 (s, 2H, 4-OCH₂), 5,47 (s, 1H, OH), 7,29 (s, 1H, H-6), 7,68 (s, 1H, H-3).

¹³C-NMR (75,5 MHz, *d*₆-DMSO): δ 51,9 (OCH₃), 52,0 (OCH₃), 59,8 (CH₂OH), 65,3 (CH₂), 65,6 (CH₂), 110,5 (C-3), 111,7 (C-6), 134,5 (C-1), 139,1 (C-2), 145,2 (C-5), 151,7 (C-4), 168,5 (COOCH₃), 168,8 (COOCH₃).

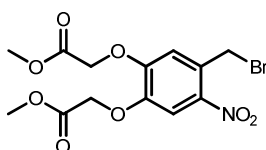
HRMS ber. 330,0820, gef. 330,0826 ([M+H]⁺)

Schmp. 125 °C

R_f (DC) 0,14 (AcOEt/*n*-Hexan = 1/1)

t_R (HPLC) 11,27 min (5–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylbromid



45

5,0 g (15,19 mmol) **44** und 4,21 ml (30,37 mmol) Et₃N wurden in 50 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf 0 °C gekühlt und dann langsam mit 1,77 ml (22,78 mmol) Methansulfonylchlorid in 5 ml CH₂Cl₂ versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde die Reaktionsmischung zweimal mit gesätt. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml THF gelöst und nach der Zugabe von 5,28 g (60,74 mmol) LiBr 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde THF im Vakuum entfernt, der Rückstand in CH₂Cl₂ gelöst und zweimal mit gesätt. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit dest. H₂O gewaschen. Nach Trocknen mit MgSO₄ und Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurden 5,74 g (14,64 mmol, 96 %) **45** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,72 (s, 6H, OCH₃), 4,89 (s, 2H, CH₂Br), 5,01 (s, 4H, OCH₂), 7,37 (s, 1H, H-6), 7,69 (s, 1H, H-3).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 30,4 (CH₂Br), 52,0 (OCH₃), 65,3 (OCH₂), 65,5 (OCH₂), 111,3 (C-3), 116,4 (C-6), 127,4 (C-1), 140,6 (C-2), 146,8 (C-5), 151,1 (C-4), 168,3 (COOCH₃), 168,6 (COOCH₃).

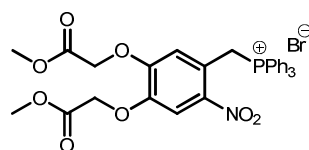
HRMS ber. 391,9976, gef. 391,9965 ([M+H]⁺)

Schmp. 108 °C

R_f (DC) 0,41 (THF/*n*-Hexan = 1/1)

t_R (HPLC) 14,95 min (5–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

[4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl]triphenylphosphoniumbromid



46

9,69 g (24,70 mmol) **45** und 6,48 g (24,70 mmol) Triphenylphosphin wurden in 150 ml Toluol 15 h unter Rückfluss gerührt. Der erhaltene Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Es wurden 13,46 g (20,57 mmol, 84 %) **46** als hellbrauner Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,56 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 4,77 (s, 2H, CH₂), 5,00 (s, 2H, CH₂), 5,37 (d, ²J(H-P) = 14,4, 2H, PCH₂), 6,96 (d, ⁴J(H-P) = 1,8, 1H, H-6), 7,59 (s, 1H, H-3), 7,60–7,66 (m, 6H, PhH-2/6), 7,69–7,76 (m, 6H, PhH-3/5), 7,91 (t, ³J = 7,1, 3H, PhH-4).

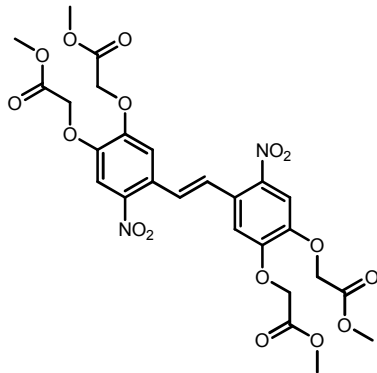
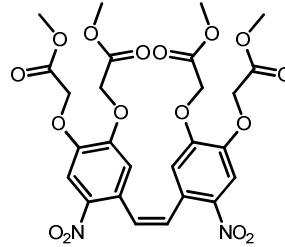
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,0 (d, ¹J(C-P) = 49,5, PCH₂), 52,0 (OCH₃), 52,1 (OCH₃), 65,1 (OCH₂), 65,5 (OCH₂), 111,4 (C-3), 116,8 (C-6), 117,4 (d, ¹J(C-P) = 85,3, 3C, PhC-1), 118,6 (d, ²J(C-P) = 8,6, C-1), 130,1 (d, ³J(C-P) = 12,4, 6C, PhC-3/5), 133,9 (d, ²J(C-P) = 9,8, 6C, PhC-2/6), 135,2 (3C, PhC-4), 141,1 (C-2), 141,2 (C-2), 147,0 (C-4), 151,5 (C-5), 167,8 (COOCH₃), 168,4 (COOCH₃).

HRMS ber. 574,1625, gef. 574,1626 ([M-Br]⁺)

Schmp. 164 °C

t_R (HPLC) 12,99 min (5–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

***trans*-1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethen (47a) und *cis*-1,2-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]ethen (47b)**

**47a****47b**

6,32 g (9,66 mmol) wurden **46** in 200 ml trockenem THF gelöst. Unter Schutzgas und bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 3,86 ml (9,66 mmol) BuLi langsam zugetropft. Die entstandene dunkelrot gefärbte Reaktionslösung wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von 3,16 g (9,66 mmol) **43** in 100 ml THF innerhalb von 30 min zum Reaktionsgemisch hinzugegeben und es wurde 18 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in CH_2Cl_2 gelöst, zweimal mit 100 ml H_2O gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Nach Reinigung mittels Flash-SC (AcOEt/*n*-Hexan = 1/5 bis 1/2) wurden 5,08 g (8,16 mmol, 85 %) eines gelben Produktgemisches der *trans/cis*-Isomere **47a** und **47b** im Verhältnis 1 zu 6 erhalten.

Für die Charakterisierung wurden 65,8 mg des Produktgemisches mittels präp. HPLC (30–70 % B in A, 0–40 min, $13,8\text{ ml min}^{-1}$, Nucleodur C 18 ec, **47b**: $t_{\text{R}} = 34,7\text{ min}$ und **47a**: $t_{\text{R}} = 36,0\text{ min}$) getrennt.

Zur Isomerisierung vom *cis*-Stilben zum *trans*-Stilben wie von BESTMANN 1969 beschrieben¹¹³ wurden 105 mg (0,17 mmol) des Stilbengemisches aus **47a** und **47b** in 6 ml AcOH gelöst und mit 4 ml 33%ig. HBr in AcOH versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Rückfluss gerührt. Nach kurzem Abkühlen wurde die Reaktionslösung auf Eiswasser gegossen und über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit AcOH und Wasser gewaschen. Die Reinigung mittels präp. HPLC (30–70 % B in A, 0–40 min, $13,8\text{ ml min}^{-1}$, Nucleodur C 18 ec, $t_{\text{R}} = 36,0\text{ min}$) und anschließende Lyophilisierung ergaben 17,0 mg (0,03 mmol, 18 %) **47a** als hellgelben Feststoff.

47a

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 3,73 (s, 12H, OCH_3), 5,02 (s, 4H, CH_2), 5,11 (s, 4H, CH_2), 7,28 (s, 2H, H-6), 7,45 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7,66 (s, 2H, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 51,9 (OCH_3), 65,3 (CH_2), 65,5 (CH_2), 110,3 (C-3), 112,0 (C-6), 127,0 (C-1), 127,6 ($\text{CH}=\text{CH}$), 140,8 (C-2), 146,6 (C-4), 151,2 (C-5), 168,5 (COOCH_3), 168,6 (COOCH_3).

HRMS ber. 645,1175, gef. 645,1180 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)

Schmp. 167,9 - 168,3 $^{\circ}\text{C}$

R_{f} (DC) 0,55 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_{R} (HPLC) 16,93 min (30–70 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

47b

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,54 (s, 6H, OCH₃), 3,71 (s, 6H, OCH₃), 4,58 (s, 4H, CH₂), 4,97 (s, 4H, CH₂), 6,36 (s, 2H, H-6), 7,00 (s, 2H, CH=CH), 7,72 (s, 2H, H-3).

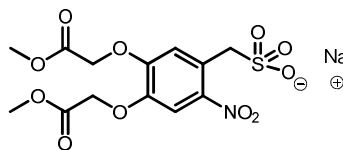
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 51,8 (OCH₃), 52,0 (OCH₃), 65,2 (CH₂), 65,6 (CH₂), 110,2 (C-3), 115,1 (C-6), 126,9 (C-1), 128,1 (CH=CH), 140,7 (C-2), 146,3 (C-4), 151,1 (C-5), 168,1 (CO₂CH₃), 168,6 (COOCH₃).

HRMS ber. 645,1178, gef. 645,1167 ([M+Na]⁺)

Schmp. 150 °C

R_f (DC) 0,52 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 16,52 min (30–70 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

Natrium-4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl-sulfonat**51**

5,97 g (14,27 mmol) **45** und 1,8 g (14,27 mmol) Na₂SO₃ wurden in 200 ml H₂O/Aceton (1/1) gelöst und 8,5 h unter Rückfluß gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und der Umkristallisation aus EtOH wurden 5,08 g (12,24 mmol, 86 %) **51** als gelber Feststoff erhalten.

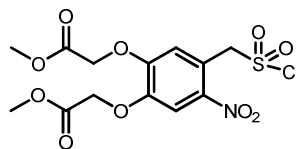
¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,76 (s, 6H, OCH₃), 3,55 (s, 2H, CH₂S), 4,88 (s, 2H, OCH₂), 4,92 (s, 2H, OCH₂), 7,00 (s, 1H, H-6), 7,63 (s, 2H, H-3).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 52,1 (CH₂S), 52,4 (OCH₃), 52,4 (OCH₃), 65,2 (CH₂), 65,5 (CH₂), 111,0 (C-3), 116,9 (C-6), 121,6 (C-1), 142,1 (C-2), 145,6 (C-5), 149,9 (C-4), 170,2 (CO₂CH₃), 170,5 (COOCH₃).

HRMS ber. 394,0439, gef. 394,0445 ([M-Na+2H]⁺)

Schmp. 73 °C

t_R (HPLC) 8,02 min (5–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

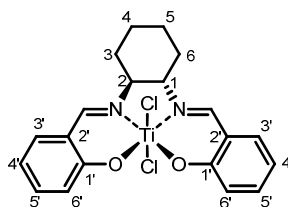
4,5-Bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylsulfonchlorid**52**

4,90 g (11,80 mmol) **51** wurden in 100 ml Sulfolan/MeCN (1/1) gelöst, langsam mit 7 ml (76,47 mmol) Phosphorylchlorid versetzt und 45 min bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde Eiswasser in die Reaktionslösung gegeben und der entstandene Niederschlag abgesaugt. Es wurden 1,4 g (3,4 mmol, 29 %) **52** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,72 (s, 6H, OCH₃), 4,89 (s, 2H, CH₂S), 5,01 (s, 4H, OCH₂), 7,37 (s, 1H, H-6), 7,69 (s, 1H, H-3).

| | |
|-------------------------------|---|
| HRMS | ber. 412,0100, gef. 412,0108 ($[M+H]^+$) |
| Schmp. | 128 °C |
| R_f(DC) | 0,56 (<i>n</i> -Hexan/AcOEt = 1/1) |
| t_R(HPLC) | 8,01 min (5–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) |

Ti[(Salen)Cl₂]-Komplex¹¹⁵



54

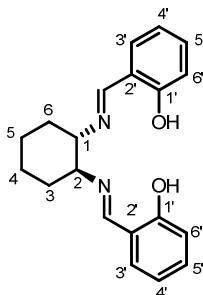
Zu 1,65 ml (5,58 mmol) $Ti(O-iPr)_4$ in 5 ml Toluol wurde langsam unter N_2 eine Lösung von 1,8 g (5,58 mmol) Salen (**55**) in 2,23 ml Toluol hinzugegeben. Es wurde 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 32,7 ml Toluol auf 40 ml aufgefüllt und langsam mit 1,39 ml (11 mmol) Trimethylsilylchlorid versetzt. Nach 8 h Rühren bei RT fiel das Produkt als roter Niederschlag aus und wurde abfiltriert. Nach Lyophilisierung wurden 2,38 g (5,41 mmol, 97 %) des Katalysatorkomplexes **54** als feines rotes Pulver erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 1,41-1,47 (m, 2H, H-3 o. H-6), 1,96 (s, 2H, H-4 o. H-5), 2,30 (s, 2H, H-4 o. H-5), 2,66-2,69 (m, 2H, H-3 o. H-6), 3,86 (s, 2H, H-1/2), 6,82 (d, $^3J = 8,1$, 2H, H-6'), 7,18 (t, $^3J = 7,4$, 2H, H-4'), 7,64 (t, $^3J = 7,7$, 2H, H-5'), 7,94 (d, $^3J = 7,2$, 2H, H-3'), 8,75 (s, 2H, Ph-CHN).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 23,6 (2C, C-4/5), 28,4 (2C, C-3/6), 68,0 (CH₂, C-1/2), 115,3 (C-6'), 122,7 (C-4'), 125,6 (C-2'), 136,0 (C-3'), 136,2 (C-5'), 160,6 (Ph-CHN), 161,5 (C-1').

| | |
|-------------------------------|--|
| HRMS | ber. 323,1754, gef. 323,1762 ($[M-TiCl_2+H]^+$) |
| Schmp. | 330-350 °C |
| R_f(DC) | 0,09 (<i>n</i> -Hexan/AcOEt = 1/1) |
| t_R(HPLC) | 16,17 min (5–95 % B in A, 0-30 min, Nucleodur C 18 ec) |

trans-1,2-Bis(2-hydroxybenzylidenaminocyclohexan) (Salen)¹¹⁶



55

1,82 ml (17,40 mmol) Salicylaldehyd wurden in 10 ml EtOH gelöst und mit einer Lösung, bestehend aus 2,42 g (8,7 mmol) *trans*-1,2-Diammonium-cyclohexantartat, 3,61 g (26,1 mmol) K_2CO_3 , und 30 ml H_2O , versetzt. Anschließend wurde 1 h bei RT gerührt, 20 ml H_2O wurden hinzugefügt und die erhaltene Lösung mit Et_2O extrahiert. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Na_2SO_4 wurde

das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene gelbe Öl aus EtOH umkristallisiert. Es konnten 1,94 g (6,02 mmol, 69 %) **55** als hellgelbes Öl erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,59-1,88 (m, 8H, H-3/4/5/6), 3,37-3,40 (m, 2H, H-1/2), 6,81 (d, ³J = 7,7, 2H, H-6'), 6,82 (t, ³J = 7,0, 2H, H-4'), 7,26 (t, ³J = 7,7, 2H, H-5'), 7,33 (d, ³J = 7,2, 2H, H-3'), 8,47 (s, 2H, Ph-CHN), 13,33 (s, 2H, OH).

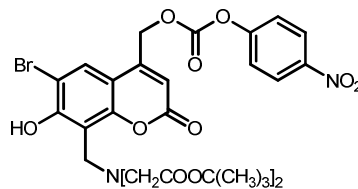
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 23,7 (2C, C-4/5), 32,5 (2C, C-3/6), 71,3 (2C, C-1/2), 116,3 (C-5'), 118,5 (C-3'), 131,6 (C-6'), 132,2 (C-4'), 160,4 (NCHPh), 165,0 (C-1').

ESI-MS ber. 323,1, gef. 323,1 ([M+H]⁺)

R_f (DC) 0,78 (CHCl₃/MeOH = 5/1 unter Zusatz von 1% AcOH)

t_R (HPLC) 12,10 min (5–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

O-{{8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl}-O-*p*-nitrophenylcarbonat^{36b}



58

52,84 mg (0,1 mmol) **17** wurden nach Methode A in THF mit 2 Äq. DIPEA und 2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 5 h in den Aktivester **58** überführt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 33,36 min) wurden 30,0 mg (0,04 mmol, 43 %) **58** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,34 (s, 18H, 6xCH₃), 3,46 (s, 4H, NCH₂CO), 4,22 (s, 2H, Cum-CH₂N), 4,77 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,53 (s, 1H, CumH-3), 7,69 (d, ³J = 9,3, 2H, PhH-2, PhH-6), 8,09 (s, 1H, Cum H-5), 8,37 (d, ³J = 9,0, 2H, PhH-3, PhH-5), 11,02 (bs, 1H, OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (CH₃), 46,5 (Cum-CH₂N), 54,4 (NCH₂CO), 59,1 (Cum-CH₂O), 80,3 (C(CH₃)₃), 111,5 (CumC-3), 111,6 (CumC-4, CumC-6), 121,2 (CumC-8), 122,3 (2C, PhC-2, PhC-6), 125,5 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,7 (CumC-5), 145,5 (PhC-4), 148,5 (CumC-7/CumC-8a), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 154,8 (PhC-1), 155,4 (OCO₂/CumC-4), 155,6 (OCO₂/CumC-4), 158,9 (CumC-2), 169,6 (OCOC(CH₃)₃).

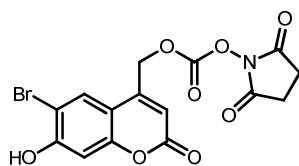
HRMS ber. 693,1290, gef. 693,1293 ([M+H]⁺)

Schmp. 51 °C

R_f (DC) 0,85 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 18,29 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

O-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-O-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-carbonat

**60**

135,53 mg (0,50 mmol) **16** wurden nach Methode B in DMF innerhalb von 12 h in den Aktivester **60** überführt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–60 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 20,68$ min) wurden 84,1 mg (0,21 mmol, 41 %) **60** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,83 (s, 4H, (CH₂)₂), 5,70 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,26 (s, 1H, CumH-3), 6,93 (s, 1H, CumH-8), 7,93 (s, 1H, CumH-5), 11,57 (s, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 25,4 ((CH₂)₂), 67,4 (Cum-CH₂), 103,2 (CumC-8), 106,3 (CumC-6), 110,0 (CumC-3), 110,1 (CumC-4a), 128,7 (CumC-5), 147,5 (CumC-4), 150,9 (CO₃), 153,9 (CumC-8a), 157,7 (CumC-7), 159,3 (CumC-2), 169,7 (NCOCH₂).

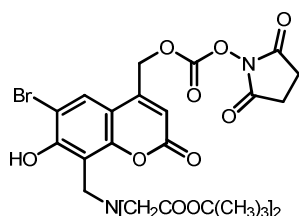
HRMS ber. 411,9663; gef. 411,9670 ([M+H]⁺)

Schmp. 177 °C (Zers.)

R_f (DC) 0,83 (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1)

t_R (HPLC) 9,17 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

O-[[8-[Bis(tert-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl]-O-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat

**61**

105,68 mg (0,20 mmol) **17** wurden nach Methode B in DMF innerhalb von 12 h in den Aktivester **61** überführt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 31,09$ min) wurden 24,1 mg (0,04 mmol, 17 %) **61** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,43 (s, 18H, 6xCH₃), 2,83 (s, 4H, CH₂CON), 3,47 (s, 4H, NCH₂CO), 4,18 (s, 2H, Cum-CH₂N), 5,71 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,28 (s, 1H, CumH-3), 7,93 (s, 1H, Cum H-5).

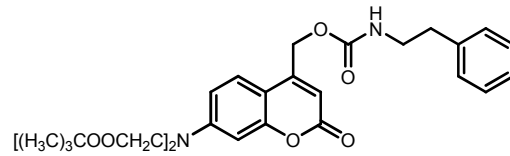
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 25,4 (CH₂CON), 27,7 (CH₃), 47,9 (Cum-CH₂N), 54,7 (NCH₂CO), 67,4 (Cum-CH₂O), 81,5 (C(CH₃)₃), 106,2 (CumC-6), 109,89 (CumC-3), 109,93 (CumC-8), 110,2 (CumC-4a), 127,5 (CumC-5), 147,8 (CumC-4), 150,9 (OCON), 151,8 (CumC-7/CumC-8a), 157,5 (CumC-7/CumC-8a), 158,8 (CumC-2), 169,7 (OCOC(CH₃)₃), 169,8 (CON).

HRMS ber. 669,1290; gef. 669,1285 ([M+H]⁺)

Schmp. 57 °C

| | |
|--------------|--|
| R_f (DC) | 0,46 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 19/1), 0,57 (<i>n</i> -Hexan/AcOEt = 1/1) |
| t_R (HPLC) | 17,24 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) |

***N*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-2-phenylethylamin**

**65**

207 mg (0,49 mmol) **12** wurden nach Methode A in CH₂Cl₂ mit 1,2 Äq. DIPEA und 1,2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 1 h in den Aktivester **56** überführt und dann nach Methode C in CH₂Cl₂ mit 2 Äq. Phenylethylamin und 3 Äq. DIPEA innerhalb von 12 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 37,50 min) wurden 110,3 mg (0,20 mmol, 40 %) **65** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 2,74 (t, ³J = 7,2, 2H, NHCH₂CH₂), 3,23 (q, ³J = 6,6, 2H, NHCH₂CH₂), 4,19 (s, 4H, NCH₂CO), 5,22 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,04 (s, 1H, CumH-3), 6,47 (dd, ⁴J = 2,1, 1H, PhH-8), 6,57 (dd, ⁴J = 2,3, ³J = 8,9, 1H, PhH-6), 7,19-7,31 (m, 5H, PhH-2, PhH-3, PhH-4, PhH-5, PhH-6), 7,50 (d, ³J = 9,0, 1H, CumH-5), 7,60 (t, ³J = 5,4, 1H, NH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (C(CH₃)₃), 35,3 (NHCH₂CH₂), 41,9 (NHCH₂CH₂), 53,5 (NCH₂CO), 60,8 (Cum-CH₂O), 81,1 (C(CH₃)₃), 98,2 (CumC-8), 106,0 (CumC-3), 107,0 (CumC-4a), 109,1 (CumC-6), 125,2 (CumC-5), 126,1 (PhC-4), 128,3 (2C, PhC-3, PhC-5), 128,6 (2C, PhC-2, PhC-6), 139,2 (PhC-1), 151,3 (CumC-7), 151,9 (CumC-4), 155,0 (CumC-8a), 155,3 (OCONH), 160,4 (CumC-2), 168,8 (OCOC(CH₃)₃).

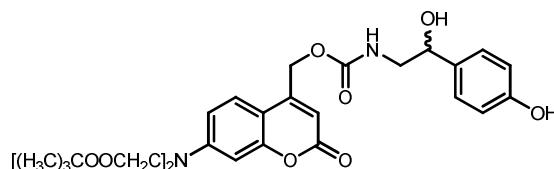
HRMS ber. 567,2701, gef. 567,2734 ([M+H]⁺)

Schmp. 65 °C

R_f (DC) 0,94 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 17,85 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-D,L-octopamin**

**66**

a) 106 mg (0,25 mmol) **12** wurden nach Methode A in CH₂Cl₂ mit 1,2 Äq. DIPEA und 1,2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 1 h in den Aktivester **56** überführt und dann nach Methode C in CH₂Cl₂ mit 1,2 Äq. D,L-Octopamin-hydrochlorid und 3 Äq. DIPEA innerhalb von 12 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 28,18 min) wurden 47,4 mg (0,08 mmol, 31 %) **66** als hellgelber Feststoff erhalten.

b) 209,8 mg (0,5 mmol) **12** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 5,5 h in den Aktivester *O*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**59**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. D,L-Octopamin-hydrochlorid innerhalb von 45 min umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (40–80 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t*_R = 33,67 min) wurden 149 mg (0,25 mmol, 50 %) **66** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, CH₃), 3,13-3,18 (m, 2H, NHCH₂CH), 4,19 (s, 4H, NCH₂), 4,51 (t, ³J = 6,3, 1H, CHOH), 5,22 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,09 (s, 1H, CumH-3), 6,47 (d, ⁴J = 2,1, 1H, CumH-8), 6,57 (dd, ⁴J = 2,1, ³J = 9,0, 1H, CumH-6), 6,71 (d, ³J = 8,1, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,11 (d, ³J = 8,1, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,47-7,52 (m, 2H, CumH-5, NH), 9,23 (bs, 1H, Ph-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (C(CH₃)₃), 47,7 (NHCH₂), 48,6 (NHCH₂CH), 53,5 (NCH₂COO), 60,8 (Cum-CH₂O), 71,0 (CHOH), 81,1 (C(CH₃)₃), 98,2 (CumC-8), 105,9 (CumC-3), 107,5 (CumC-4a), 109,1 (CumC-6), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 125,2 (CumC-5), 127,1 (2C, PhC-2, PhC-6), 133,8 (PhC-1), 151,3 (CumC-7), 152,0 (CumC-4), 155,0 (CumC-8a), 155,5 (OCONH), 156,4 (PhC-4), 160,5 (CumC-2), 168,8 (OCOC(CH₃)₃).

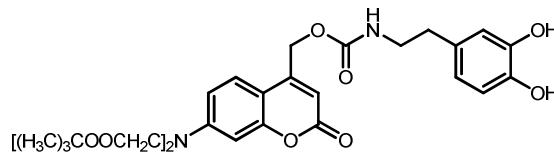
HRMS ber. 621,2419, gef. 621,2406 ([M+Na]⁺)

Schmp. 116 °C

R_f (DC) 0,22 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1), 0,25 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

*t*_R (HPLC) 13,81 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

N-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-dopamin



67

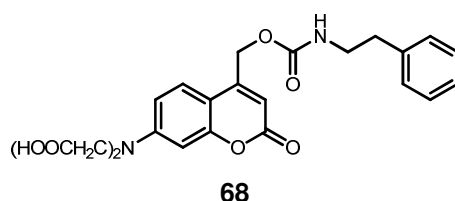
121,4 mg (0,29 mmol) **12** wurden nach Methode A in CH₂Cl₂ mit 1,2 Äq. DIPEA und 1,2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 1 h in den Aktivester **56** überführt und dann nach Methode C in CH₂Cl₂ mit 1 Äq. Dopamin-hydrochlorid und 2 Äq. DIPEA innerhalb von 3 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (30–95 % B in A, 0-60 min, 9,2 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t*_R = 39,74 min) wurden 20,4 mg (0,03 mmol, 12 %) **67** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 2,55-2,67 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 3,13-3,19 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 4,19 (s, 4H, NCH₂), 5,23 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,06 (s, 1H, CumH-3), 6,44 (dd, ⁴J = 1,4, ³J = 8,2, 1H, PhH-6), 6,47 (d, ⁴J = 2,2, 1H, CumH-8), 6,58-6,65 (m, 3H, CumH-6, PhH-2, PhH-5), 7,51 (d, ³J = 9,1, 1H, CumH-5), 7,55 (t, ³J = 5,1, 1H, NH), 8,67 (bs, 2H, Ph-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (C(CH₃)₃), 34,9 (NHCH₂CH₂), 42,4 (NHCH₂CH₂), 53,5 (NCH₂CO), 60,8 (Cum-CH₂O), 81,1 (C(CH₃)₃), 98,2 (CumC-8), 106,0 (CumC-3), 107,0 (CumC-4a), 109,2 (CumC-6), 115,5 (PhC-5), 116,0 (PhC-2), 119,2 (PhC-6), 125,2 (CumC-5), 129,9 (PhC-1), 143,6 (PhC-3), 145,1 (PhC-4), 151,4 (CumC-7), 152,0 (CumC-4), 155,0 (CumC-8a), 155,3 (OCONH), 160,5 (CumC-2), 168,8 (OCOC(CH₃)₃).

| | |
|--------------------------------|---|
| HRMS | ber. 599,2599, gef. 599,2599 ($[M+H]^+$) |
| Schmp. | 71 °C |
| R_f (DC) | 0,61 ($CH_2Cl_2/MeOH = 19/1$), 0,25 (n -Hexan/THF = 2/1) |
| t_R (HPLC) | 15,49 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec) |

***N*-{{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-2-phenylethylamin (BCMACMOC-*caged* Phenylethylamin)**



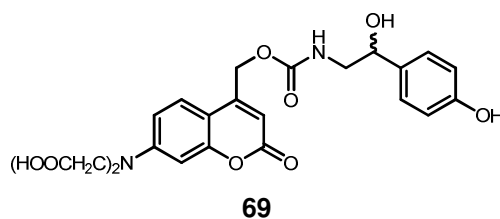
70,0 mg (0,12 mmol) **65** wurden nach Methode E hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 20,14$ min). Es resultierten 25,3 mg (0,06 mmol, 45 %) **68** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,74 (t, ³J = 7,2, 2H, NHCH₂CH₂), 3,26 (q, ³J = 6,6, 2H, NHCH₂CH₂), 4,22 (s, 4H, NCH₂), 5,22 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,03 (s, 1H, CumH-3), 6,48 (s, 1H, CumH-8), 6,59 (dd, ⁴J = 1,8, ³J = 9,0, 1H, CumH-6), 7,20–7,34 (m, 5H, CumH-6, PhH-2, PhH-3, PhH-4, PhH-5), 7,49 (d, ³J = 9,0, 1H, CumH-5), 7,61 (t, ³J = 5,4, 1H, NH), 12,94 (bs, 2H, COOH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 35,3 (NHCH₂CH₂), 41,9 (NHCH₂CH₂), 52,9 (NCH₂COO), 60,8 (Cum-CH₂O), 98,0 (CumC-8), 106,0 (CumC-3), 106,9 (CumC-4a), 109,1 (CumC-6), 125,3 (CumC-5), 126,1 (PhC-4), 128,3 (2C, PhC-3, PhC-5), 128,7 (2C, PhC-2, PhC-6), 139,2 (PhC-1), 151,4 (CumC-7), 151,9 (CumC-4), 155,1 (CumC-8a), 155,3 (OCONH), 160,5 (CumC-2), 171,4 (COOH).

| | |
|--------------------------------|--|
| HRMS | ber. 455,1449; gef. 455,1448 ($[M+H]^+$) |
| Schmp. | 179 °C |
| t_R (HPLC) | 9,32 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec) |

***N*-{{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-D,L-octopamin (BCMACMOC-*caged* Octopamin)**



30,1 mg (0,05 mmol) **66** wurden nach Methode E innerhalb von 1,5 h hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (5–50 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 23,15$ min). Es resultierten 7,1 mg (0,02 mmol, 29 %) **69** als hellgelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,13-3,19 (m, 2H, NHCH₂CH), 4,23 (s, 4H, NCH₂), 4,51 (t, ³J = 6,2, 1H, NHCH₂CH), 5,21 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,09 (s, 1H, CumH-3), 6,48 (d, ⁴J = 2,1, 1H, CumH-8), 6,60 (dd, ⁴J = 2,1, ³J = 9,0, 1H, CumH-6), 6,71 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,12 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,48-7,51 (m, 2H, CumH-5, NH), 9,24 (bs, 1H, Ph-OH), 12,83 (bs, 2H, COOH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 48,6 (NHCH₂CH), 52,8 (NCH₂CO), 60,8 (Cum-CH₂O), 71,0 (CHOH), 98,1 (CumC-8), 105,9 (CumC-3), 106,9 (CumC-4a), 109,1 (CumC-6), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 125,2 (CumC-5), 127,2 (2C, PhC-2, PhC-6), 133,8 (PhC-1), 151,4 (CumC-7), 151,9 (CumC-4), 155,0 (CumC-8a), 155,5 (OCONH), 156,4 (PhC-4), 160,5 (CumC-2), 171,3 (COOH).

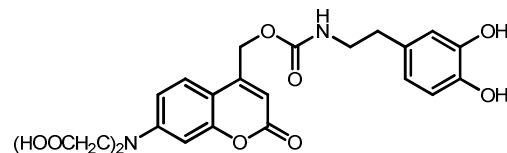
Elementaranalyse C₂₃H₂₂N₂O₁₀ ber. C 56,79 %, H 4,56 %, N 5,76 %;
gef. C 56,88 %, H 4,52 %, N 5,66 %

HRMS ber. 509,1167; gef. 509,1162 ([M+Na]⁺)

Schmp. 156 °C

t_R (HPLC) 4,75 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}dopamin (BCMCMOC-*caged* Dopamin)**



70

20,4 mg (0,03 mmol) **67** wurden nach Methode E innerhalb von 1 h hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-60 min, 9,2 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 13,95 min). Es resultierten 16,1 mg (0,03 mmol, 97 %) **70** als hellgelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,55 (t, 2H, NHCH₂CH₂), 3,13-3,20 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 4,23 (s, 4H, NCH₂), 5,22 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,06 (s, 1H, CumH-3), 6,43 (dd, ⁴J = 1,8, ³J = 8,1, 1H, PhH-6), 6,48 (d, ⁴J = 1,8, 1H, CumH-8), 6,58-6,65 (m, 3H, CumH-6, PhH-2, PhH-5), 7,50 (d, ³J = 9,0, 1H, CumH-5), 7,54 (t, ³J = 5,6, 1H, NH), 8,63 (bs, 1H, Ph-OH), 8,72 (bs, 1H, Ph-OH), 12,87 (bs, 2H, COOH).

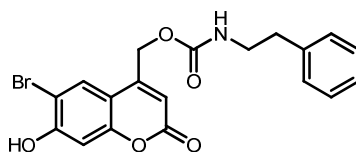
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 34,9 (NHCH₂CH₂), 42,4 (NHCH₂CH₂), 52,9 (NCH₂COO), 60,8 (Cum-CH₂O), 98,1 (CumC-8), 105,9 (CumC-3), 106,9 (CumC-4a), 109,2 (CumC-6), 115,5 (PhC-5), 116,0 (PhC-2), 119,3 (PhC-6), 125,2 (CumC-5), 129,9 (PhC-1), 143,6 (PhC-3), 145,1 (PhC-4), 151,4 (CumC-7), 151,9 (CumC-4), 155,1 (CumC-8a), 155,3 (OCONH), 160,5 (CumC-2), 171,3 (COOH).

HRMS ber. 487,1347; gef. 487,1350 ([M+H]⁺)

Schmp. 129 °C

t_R (HPLC) 6,12 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]phenylethylamin
(BHCmoc-caged Phenylethylamin)**



71

208 mg (0,77 mmol) **16** wurden nach Methode A in CH₂Cl₂ mit 2 Äq. DIPEA und 2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 1 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**57**) überführt und dann nach Methode C in CH₂Cl₂ mit 2 Äq. Phenylethylamin und 2,4 Äq. DMAP innerhalb von 5 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t*_R = 27,92 min) wurden 138,2 mg (0,33 mmol, 43 %) **71** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,75 (t, ³*J* = 7,2, 2H, NHCH₂CH₂), 3,25 (q, ³*J* = 6,6, 2H, NHCH₂CH₂), 5,25 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,16 (s, 1H, CumH-3), 6,91 (s, 1H, CumH-8), 7,19–7,31 (m, 5H, PhH-2, PhH-3, PhH-4, PhH-5, PhH-6), 7,62 (t, ³*J* = 5,5, 1H, NH), 7,88 (s, 1H, CumH-5), 11,48 (bs, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 35,2 (NCH₂CH₂), 41,9 (NCH₂CH₂), 60,8 (Cum-CH₂O), 103,2 (CumC-8), 106,2 (CumC-6), 108,5 (CumC-3), 110,5 (CumC-4a), 126,1 (PhC-4), 128,3 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,4 (CumC-5), 128,6 (2C, PhC-3, PhC-5), 139,2 (PhC-1), 151,2 (CumC-4), 153,8 (CumC-7/CumC-8a), 155,2 (OCONH), 157,4 (CumC-7/CumC-8a), 159,7 (CumC-2).

Elementaranalyse C₁₉H₁₆BrNO₅: ber. C 54,56 %, H 3,86 %, N 3,35 %;
gef. C 54,68 %, H 3,65 %, N 3,51 %

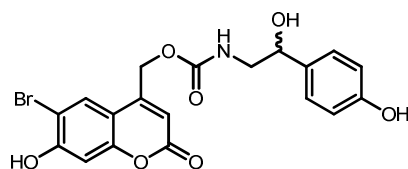
HRMS ber. 455,9843, gef. 455,9870 ([M+K]⁺)

Schmp. 190 °C

R_f (DC) 0,29 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 12,85 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-D,L-octopamin (BHCmoc-caged Octopamin)**



72

203 mg (0,75 mmol) **16** wurden nach Methode A in THF mit 1,2 Äq. DIPEA und 1,2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 2 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**57**) überführt und dann nach Methode D mit 1,2 Äq D,L-Octopamin-hydrochlorid innerhalb von 2 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t*_R = 16,21 min) wurden 122,5 mg (0,27 mmol, 36 %) **72** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,16 (t, ³J = 5,7, 2H, NHCH₂), 4,53 (t, ³J = 6,2, 1H, CHOH), 5,14 (bs, 1H, CHOH), 5,24 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,23 (s, 1H, CumH-3), 6,71 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 6,91 (s, 1H, CumH-8), 7,12 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,35 (t, ³J = 5,6, 1H, NH), 7,87 (s, 1H, CumH-5), 9,11 (bs, 1H, Ph-OH), 11,34 (bs, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 48,6 (NCH₂), 60,8 (Cum-CH₂O), 71,0 (CHOH), 103,2 (CumC-8), 106,2 (CumC-6), 108,4 (CumC-3), 110,5 (CumC-4a), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,2 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,4 (CumC-5), 133,8 (PhC-1), 151,2 (CumC-4), 153,8 (CumC-7/CumC-8a), 155,4 (Cum-CH₂OCO), 156,4 (PhC-4), 157,4 (CumC-7/CumC-8a), 159,7 (CumC-2).

Elementaranalyse C₁₉H₁₆BrNO₇(×1 H₂O): ber. C 48,74 %, H 3,87 %, N 2,99 %;
gef. C 48,69 %, H 3,80 %, N 3,25 %

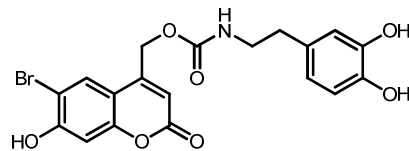
HRMS ber. 450,0183; gef. 450,0188 ([M+H]⁺)

Schmp. 161 °C

R_f(DC) 0,26 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1 unter Zusatz von 1% AcOH)

t_R(HPLC) 7,52 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]dopamin**



73

1,19 g (4,40 mmol) **16** wurden nach Methode A in THF mit 1,2 Äq. DIPEA und 1,2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 1 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**57**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. Dopamin-hydrochlorid innerhalb von 8 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 50/1 bis 10/1) wurden 896,6 mg (1,99 mmol, 45 %) **73** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,55 (t, ³J = 7,2, 2H, NHCH₂CH₂), 3,16 (dt, ³J = 7,0, ³J = 6,4, 2H, NHCH₂CH₂), 5,25 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,19 (s, 1H, CumH-3), 6,43 (d, ³J = 7,8, 1H, PhH-6), 6,58 (s, 1H, PhH-2), 6,63 (d, ³J = 8,0, 1H, PhH-5), 6,93 (s, 1H, CumH-8), 7,57 (t, ³J = 5,4, 1H, NH), 7,87 (s, 1H, CumH-5), 8,63 (s, 1H, Ph-OH), 8,72 (s, 1H, Ph-OH), 11,52 (bs, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 34,8 (NCH₂CH₂), 42,4 (NCH₂CH₂), 60,8 (Cum-CH₂O), 103,2 (CumC-8), 106,2 (CumC-6), 108,5 (CumC-3), 110,5 (CumC-4a), 115,5 (PhC-5), 115,9 (PhC-2), 119,2 (PhC-6), 128,4 (CumC-5), 129,9 (PhC-1), 143,6 (PhC-4), 145,1 (PhC-3), 151,2 (CumC-4), 153,8 (CumC-8a), 155,2 (OCONH), 157,4 (CumC-7), 159,7 (CumC-2).

Elementaranalyse C₁₉H₁₆BrNO₇ (1 H₂O): ber. C 48,74 %, H 3,87 %, N 2,99 %;
gef. C 48,36 %, H 3,92 %, N 3,00 %

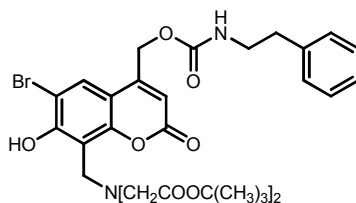
HRMS ber. 450,0183, gef. 450,0181 ([M+H]⁺)

Schmp. 184 °C

R_f(DC) 0,13 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1), 0,13 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R(HPLC) 8,89 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}phenylethylamin**



74

201,1 mg (0,38 mmol) **17** wurden nach Methode A in THF mit 2 Äq. DIPEA und 2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 5 h in den Aktivester *O*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl}-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**58**) überführt und dann nach Methode C in DMF mit 2 Äq. Phenylethylamin und 2,4 Äq. DMAP innerhalb von 1 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t_R* = 41,37 min) wurden 54 mg (0,08 mmol, 21 %) **74** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 2,74 (t, ³J = 7,2, 2H, NCH₂CH₂), 3,26 (q, ³J = 6,6, 2H, NCH₂CO), 3,46 (s, 4H, NCH₂CO), 4,17 (s, 2H, CH₂NCH₂CO), 5,26 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,17 (s, 1H, CumH-3), 7,19–7,31 (m, 5H, PhH-2, PhH-3, PhH-4, PhH-5, PhH-6), 7,63 (t, ³J = 5,4, 1H, NH), 7,87 (s, 1H, CumH-5), 11,88 (bs, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (C(CH₃)₃), 35,3 (NHCH₂CH₂), 41,9 (NHCH₂CH₂), 47,8 (Cum-CH₂N), 54,6 (NCH₂CO), 60,8 (Cum-CH₂O), 81,5 (C(CH₃)₃), 106,1 (CumC-6), 108,4 (CumC-3), 110,1 (CumC-8), 110,3 (CumC-4a), 126,1 (PhC-4), 127,6 (CumC-5), 128,3 (2C, PhC-3, PhC-5), 128,7 (2C, PhC-2, PhC-6), 139,2 (PhC-1), 151,5 (CumC-4), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 155,2 (OCONH), 157,3 (CumC-7/CumC-8a), 159,2 (CumC-2), 169,9 (OCOC(CH₃)₃).

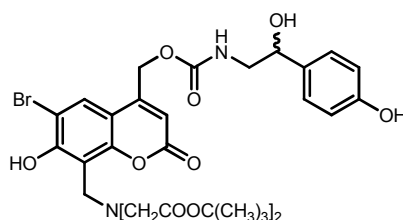
HRMS ber. 675,1912; gef. 675,1938 ([M+H]⁺)

Schmp. 67 °C (Zers.)

R_f (DC) 0,42 (*n*-Hexan/AcOEt = 2/1)

t_R (HPLC) 19,64 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}-D,L-octopamin**



75

100,2 mg (0,19 mmol) **17** wurden nach Methode A in THF mit 2 Äq. DIPEA und 2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 3 h in den Aktivester *O*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl}-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat

(58) überführt und dann nach Methode C in DMF mit 1,2 Äq. D,L-Octopamin-hydrochlorid und 2,4 Äq. DMAP innerhalb von 1 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 15,77$ min) wurden 82,4 mg (0,12 mmol, 61 %) **75** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,43 (s, 18H, C(CH₃)₃), 3,13 (t, ³J = 6,0, 2H, NCH₂CH), 3,46 (s, 4H, CH₂NCH₂CO), 4,17 (s, 2H, CH₂NCH₂CO), 4,51 (t, ³J = 6,0, 2H, CHOH), 5,25 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,23 (s, 1H, CumH-3), 6,71 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,11 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,51 (t, ³J = 5,6, 1H, NH), 7,86 (s, 1H, CumH-5), 9,24 (s, 1H, Ph-OH), 11,88 (s, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (C(CH₃)₃), 47,9 (Cum-CH₂N), 48,6 (NHCH₂CH), 54,6 (NCH₂CO), 60,8 (Cum-CH₂O), 81,5 (C(CH₃)₃), 106,1 (CumC-6), 108,3 (CumC-3), 110,1 (CumC-8), 110,3 (CumC-4a), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,1 (2C, PhC-2, PhC-6), 127,2 (CumC-5), 133,8 (PhC-1), 151,5 (CumC-4), 151,6 (CumC-7/CumC-8a), 155,4 (OCONH), 156,4 (PhC-4), 157,2 (CumC-7/CumC-8a), 159,2 (CumC-2), 169,8 (OCOC(CH₃)₃).

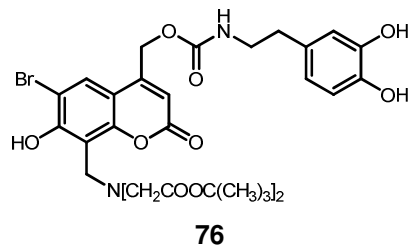
HRMS ber. 707,1810, gef. 707,1816 ([M+H]⁺)

Schmp. 74 °C

R_f (DC) 0,44 (CHCl₃/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 16,75 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}dopamin^{36b}**



101 mg (0,19 mmol) **17** wurden nach Methode A in THF mit 1,2 Äq. DIPEA und 1,2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 1,5 h in den Aktivester *O*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl}-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**58**) überführt und dann nach Methode C in DMF mit 1,2 Äq. Dopamin-hydrochlorid und 2,4 Äq. DMAP innerhalb von 1 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (50–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 22,95$ min) wurden 52,4 mg (0,07 mmol, 39 %) **76** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 2,55 (t, ³J = 7,7, 2H, NCH₂CH₂Ph), 3,15-3,20 (m, 2H, NCH₂CH₂Ph), 3,46 (s, 4H, CH₂NCH₂CO), 4,17 (s, 2H, CH₂NCH₂CO), 5,26 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,20 (s, 1H, CumH-3), 6,43 (d, ³J = 6,9, 1H, PhH-6), 6,58 (s, 1H, PhH-2), 6,63 (d, ³J = 7,8, 1H, PhH-5), 7,57 (t, ³J = 5,6, 1H, NH), 7,87 (s, 1H, CumH-5), 8,62 (s, 1H, Ph-OH), 8,72 (s, 1H, Ph-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 27,7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34,8 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 42,4 ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 47,9 ($\text{Cum-CH}_2\text{N}$), 54,7 (NCH_2CO), 60,8 ($\text{Cum-CH}_2\text{O}$), 81,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 106,1 (CumC-6), 108,4 (CumC-3), 110,1 (CumC-8), 110,3 (CumC-4a), 115,5 (PhC-5), 115,9 (PhC-2), 119,2 (PhC-6), 127,2 (CumC-5), 129,9 (PhC-1), 143,6 (PhC-4), 145,1 (PhC-3), 151,5 (CumC-4), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 155,2 (OCONH), 157,3 (CumC-7/CumC-8a), 159,2 (CumC-2), 169,8 ($\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$).

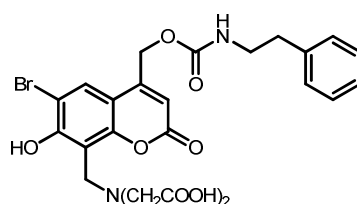
HRMS ber. 707,1815; gef. 707,1830 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 81 °C

R_f (DC) 0,43 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 19/1$)

t_R (HPLC) 16,58 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]-methoxycarbonyl}phenylethylamin (BBHCMOC-caged Phenylethylamin)**



77

30,00 mg (0,044 mmol) **74** wurden nach Methode E hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min^{-1} , Nucleodur C 18 ec, $t_R = 20,10$ min). Nach der Lyophilisierung resultierten 23,1 mg (0,041 mmol, 92 %) **77** als hellgelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 2,75 (t, $^3J = 7,2$, 2H, NCH_2CH_2), 3,26 (q, $^3J = 6,6$, 2H, NCH_2CH_2), 3,51 (s, 4H, NCH_2CO), 4,19 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CO}$), 5,25 (s, 2H, $\text{Cum-CH}_2\text{O}$), 6,16 (s, 1H, CumH-3), 7,19-7,31 (m, 5H, PhH-2 , PhH-3 , PhH-4 , PhH-5 , PhH-6), 7,62 (t, $^3J = 5,4$, 1H, NH), 7,85 (s, 1H, CumH-5), 12,63 (bs, 1H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 35,3 (NHCH_2CH_2), 41,9 (NHCH_2CH_2), 47,9 ($\text{Cum-CH}_2\text{N}$), 53,5 (NCH_2CO), 60,8 ($\text{Cum-CH}_2\text{O}$), 106,2 (CumC-6), 108,3 (CumC-3), 110,1 (CumC-4a), 110,2 (CumC-8), 126,1 (PhC-4), 127,1 (CumC-5), 128,3 (2C, PhC-3 , PhC-5), 128,7 (2C, PhC-2 , PhC-6), 139,2 (PhC-1), 151,5 (CumC-4), 151,7 (CumC-7), 155,2 (OCONH), 157,5 (CumC-8a), 159,3 (CumC-2), 172,2 (COOH).

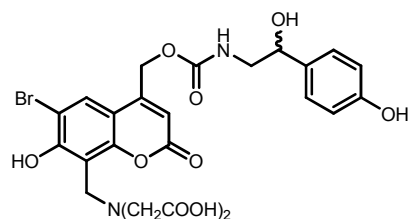
Elementaranalyse $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_9$: ber. C 51,17 %, H 4,12 %, N 4,97 %;
gef. C 51,16 %, H 4,18 %, N 4,88 %

HRMS ber. 585,0479; gef. 585,0498 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)

Schmp. 195 °C (Zers.)

t_R (HPLC) 10,59 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]-methoxycarbonyl}-D,L-octopamin (BBHCMOC-*caged* Octopamin)**

**78**

25,00 mg (0,04 mmol) **75** wurden nach Methode E hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 11,46$ min). Nach der Lyophilisierung wurden 6,1 mg (0,01 mmol, 33 %) **78** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,13 (t, ³J = 5,6, 2H, NCH₂CH₂), 3,52 (s, 4H, NCH₂COOH), 4,20 (s, 2H, CumCH₂N), 4,51 (t, ³J = 6,2, 1H, CHOH), 5,25 (s, 2H, CumCH₂O), 6,22 (s, 1H, CumH-3), 6,71 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,11 (d, ³J = 8,1, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,51 (t, ³J = 5,4, 1H, NH), 7,86 (s, 1H, CumH-5).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 47,9 (Cum-CH₂N), 48,6 (NHCH₂CH), 53,5 (NCH₂COOH), 60,8 (Cum-CH₂O), 71,0 (CHOH), 106,1 (CumC-6), 108,2 (CumC-3), 110,1 (CumC-4a), 110,2 (CumC-8), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,2 (3C, PhC-2, PhC-6, CumC-5), 133,8 (PhC-1), 151,5 (CumC-4), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 155,4 (OCON), 156,4 (PhC-4), 157,4 (CumC-7/CumC-8a), 159,3 (CumC-2), 172,1 (COOH).

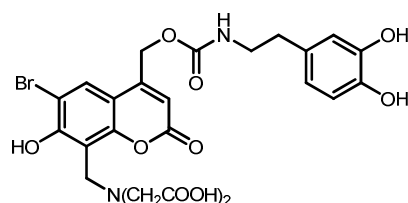
Elementaranalyse C₂₄H₂₃BrN₂O₁₁: ber. C 48,42 %, H 3,89 %, N 4,71 %, gef. C 48,28 %, H 3,63 %, N 4,61 %

HRMS ber. 595,0558, gef. 595,0558 ([M+H]⁺)

Schmp. 72 °C

t_R (HPLC) 8,63 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]-methoxycarbonyl}dopamin (BBHCMOC-*caged* Dopamin)^{36b}**

**79**

60,00 mg (0,09 mmol) **76** wurden nach Methode E hydrolysiert, wobei allerdings 12 h bei 40 °C gerührt wurde. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 13,77$ min). Nach der Lyophilisierung resultierten 46,1 mg (0,08 mmol, 86 %) **79** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,55 (t, $^3J = 7,5$, 2H, NCH₂CH₂Ph), 3,13-3,20 (m, 2H, NCH₂CH₂Ph), 3,51 (s, 4H, CH₂NCH₂CO), 4,20 (s, 2H, CH₂NCH₂CO), 5,26 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,20 (s, 1H, CumH-3), 6,44 (d, $^3J = 7,5$, 1H, PhH-6), 6,58 (s, 1H, PhH-2), 6,63 (d, $^3J = 7,8$, 1H, PhH-5), 7,57 (t, $^3J = 5,4$, 1H, NH), 7,85 (s, 1H, CumH-5), 8,63 (bs, 1H, Ph-OH), 8,71 (bs, 1H, Ph-OH), 12,67 (bs, 1H, COOH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 34,8 (NHCH₂CH₂Ph), 42,4 (NHCH₂CH₂Ph), 47,9 (Cum-CH₂N), 53,5 (NCH₂CO), 60,8 (Cum-CH₂O), 106,1 (CumC-6), 108,3 (CumC-3), 110,2 (CumC-8/4a), 115,5 (PhC-5), 115,9 (PhC-2), 119,2 (PhC-6), 127,1 (CumC-5), 129,9 (PhC-1), 143,6 (PhC-4), 145,1 (PhC-3), 151,5 (CumC-4), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 155,2 (OCONH), 157,4 (CumC-7/CumC-8a), 159,3 (CumC-2), 172,2 (COOH).

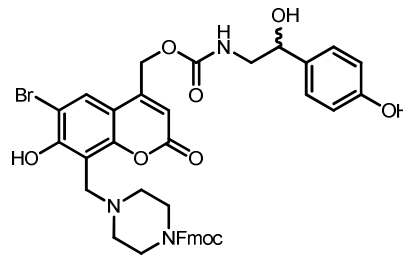
Elementaranalyse C₂₄H₂₃BrN₂O₁₁: ber. C 48,42 %, H 3,89 %, N 4,71 %;
gef. C 48,45 %, H 3,98 %, N 4,64 %

HRMS ber. 595,0558; gef. 595,0547 ([M+H]⁺)

Schmp. 201 °C (Zers.)

t_R (HPLC) 6,76 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{{6-Brom-8-{{4-[(fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]piperazin-1-yl)methyl}-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl}-D,L-octopamin**



80

180 mg (0,3 mmol) **18** wurden nach Methode B in THF mit 2 Äq. Et₃N innerhalb von 5,5 h bei 35 °C in den Aktivester *O*-{{6-Brom-8-{{4-[(fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]-(piperazin-1-yl)methyl}-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**62**) überführt und dann nach Methode D mit 2 Äq. D,L-Octopamin-hydrochlorid und 2 Äq. Et₃N innerhalb von 12 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–60 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 42,41 min) wurden 48 mg (0,06 mmol, 21 %) **80** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, 300 K, d₆-DMSO): δ 2,98 (bs, 4H, NCH₂CH₂N), 3,14 (t, $^3J = 5,8$, 2H, NCH₂CHOHPh), 3,51 (bs, 4H, NCH₂CH₂N), 4,27-4,31 (m, 3H, Cum-CH₂N, FluH-1), 4,42 (d, $^3J = 6,4$, 2H, FluCH₂), 4,51 (t, $^3J = 6,3$, 1H, CH₂CHOH), 5,28 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,28 (s, 1H, CumH-3), 6,71 (d, $^3J = 8,3$, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,12 (d, $^3J = 8,3$, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,35 (t, $^3J = 7,2$, 2H, FluH-3, FluH-8), 7,43 (t, $^3J = 7,3$, 2H, FluH-4, FluH-7), 7,53 (t, $^3J = 5,6$, 1H, NH), 7,64 (d, $^3J = 7,3$, 2H, FluH-2, FluH-9), 7,90 (d, $^3J = 7,4$, 2H, FluH-5, FluH-6), 7,98 (s, 1H, CumH-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, 300 K, d_6 -DMSO): δ 41,4 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 46,7 ($\text{NCH}_2\text{CHOHPh}$), 48,6 (FluC-1), 50,5 (Cum- CH_2N), 51,2 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 60,8 (Cum- CH_2O), 66,8 (Flu CH_2), 71,0 (CH_2CHOHPh), 107,1 (CumC-6), 107,3 (CumC-3), 108,4 (CumC-8), 110,4 (CumC-4a), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 120,1 (2C, FluC-5, FluC-6), 125,1 (2C, FluC-2, FluC-9), 127,2 (4C, PhC-2, PhC-3, PhC-6, PhC-8), 127,7 (2C, FluC-4, FluC-7), 128,6 (CumC-5), 133,8 (PhC-1), 140,8 (2C, FluC-5a, FluC-5b), 143,7 (2C, FluC-1a, FluC-9a), 151,5 (CumC-4), 152,3 (CumC-7/CumC-8a), 154,1 ($(\text{CH}_2)_2\text{NOCO}$), 155,4 (CH_2NOCO), 156,5 (PhC-4), 158,2 (CumC-7/CumC-8a), 159,1 (Cum-C-2).

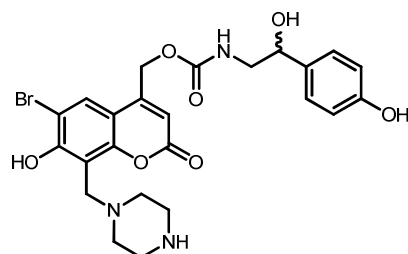
HRMS ber. 770,1708, gef. 770,1698 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 148-153 °C

R_f (DC) 0,40 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 19/1$)

t_R (HPLC) 12,49 min (5–50 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[6-Brom-7-hydroxy-8-[(piperazin-1-yl)methyl]cumarin-4-yl]methoxy-carbonyl}-D,L-octopamin (PBHCMOC-*caged* Octopamin)**



81

38,00 mg (0,05 mmol) **80** und 1 ml (10,11 mmol) Piperidin wurden in 9 ml THF 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt mittels präp. HPLC (20–60 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min^{-1} , Nucleodur C 18 ec, $t_R = 26,58$ min) gereinigt. Nach Lyophilisierung wurden 26 mg (0,05 mmol, 96 %) **81** als hellgelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 300 K, d_6 -DMSO): δ 2,81 (bs, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3,13 (t, $^3J = 6,0$, 2H, $\text{NCH}_2\text{CHOHPh}$), 3,22 (bs, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,07 (s, 2H, Cum- CH_2N), 4,51 (t, $^3J = 6,4$, 1H, CH_2CHOH), 5,26 (s, 2H, Cum- CH_2O), 6,25 (s, 1H, CumH-3), 6,71 (d, $^3J = 8,5$, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,11 (d, $^3J = 8,5$, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,52 (t, $^3J = 5,8$, 1H, COONH), 7,89 (s, 1H, CumH-5), 8,68 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, 300 K, d_6 -DMSO): δ 42,3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 48,6 ($\text{NCH}_2\text{CHOHPh}$), 48,8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 51,7 (Cum- CH_2N), 60,8 (Cum- CH_2O), 71,0 ($\text{NCH}_2\text{CHOHPh}$), 106,5 (CumC-6), 108,4 (CumC-3), 109,1 (CumC-8), 110,5 (CumC-4a), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,2 (2C, PhC-2, PhC-6), 127,5 (CumC-5), 133,8 (PhC-1), 151,6 (CumC-4), 151,8 (CumC-7/CumC-8a), 155,4 (CH_2NOCO), 156,5 (PhC-4), 157,4 (CumC-7/CumC-8a), 159,4 (CumC-2).

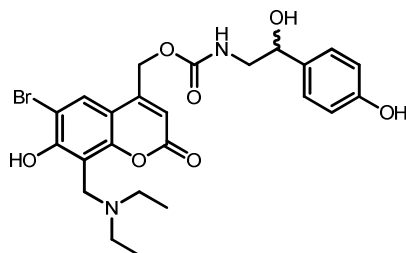
HRMS ber. 548,1027, gef. 548,1006 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 75-80 °C

R_f (DC) 0,14 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$ unter Zusatz von 1 % Et_3N)

t_R (HPLC) 5,47 min (5–95 % B in A, 0-20 min, RP-Amid Säule)

***N*-{[6-Brom-8-(diethylaminomethyl)-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}-*D,L*-octopamin (DBHCMOC-*caged* Octopamin)**

**82**

78.4 mg (0,25 mmol) **19** wurden nach Methode B in THF mit 1,5 Äq. Di(*N*-succinimidyl)carbonat und 5,5 Äq. Et₃N innerhalb von 5 h in den Aktivester *O*-{[6-Brom-8-(diethylamino)methyl-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**63**) überführt und dann nach Methode D mit 1,0 Äq. *D,L*-Octopamin-hydrochlorid und 4 Äq. Et₃N innerhalb von 30 min umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp (5–50 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t*_R = 32,59 min) wurden 42 mg (0,08 mmol, 31 %) **82** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,30 (t, ³*J* = 7,1, 6H, CH₂CH₃), 3,11-3,18 (m, 6H, CH₂CH₃, NHCH₂), 4,41 (s, 2H, Cum-CH₂N), 4,51 (t, ³*J* = 6,2, 1H, NHCH₂CHOH), 5,27 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,25 (s, 1H, CumH-3), 6,71 (d, ³*J* = 8,2, 2H, PhH-3/5), 7,11 (d, ³*J* = 8,3, 2H, PhH-2/6), 7,53 (t, ³*J* = 5,6, 1H, NH), 7,99 (s, 1H, CumH-5), 9,27 (bs, 1H, Ph-OH), 11,43 (bs, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 8,7 (CH₃), 45,2 (Cum-CH₂N), 47,3 (NCH₂CH₃), 48,6 (NHCH₂), 60,8 (Cum-CH₂O), 71,0 (NCH₂CHOH), 107,5 (CumC-8), 108,0 (CumC-3, CumC-6), 110,1 (CumC-4a), 114,8 (2C, PhC-3/5), 127,2 (2C, PhC-2/6), 129,2 (CumC-5), 133,7 (PhC-1), 151,5 (CumC-4), 152,9 (CumC-7/CumC-8a), 155,4 (CH₂OCONH), 156,5 (PhC-4), 158,2 (CumC-7/CumC-8a), 159,1 (CumC-2).

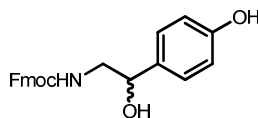
HRMS ber. 535,1074; gef. 535,1089 ([M+H]⁺)

Schmp. 53 °C

R_f (DC) 0,14 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 14,75 min (5–50 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-[(Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]-*D,L*-octopamin**

**83**

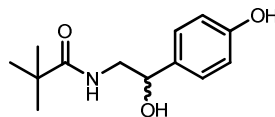
Zu 1,21 g (6,38 mmol) *D,L*-Octopamin-hydrochlorid und 1,65 ml (12,76 mmol) DIPEA in 40 ml CH₂Cl₂ wurden 1,98 g (7,66 mmol) Fmoc-Cl portionsweise zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung 1 h bei RT gerührt. Es wurde filtriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 200/0 bis 200/5) gereinigt. Es resultierten 0,96 g (2,56 mmol, 40 %) **83** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,09 (t, ³J = 5,6, 2H, NHCH₂CHOH), 4,20-4,28 (m, 3H, OCOCH₂CH), 4,50 (q, ³J = 3,3, 1H, CHOH), 5,27 (d, ³J = 3,4, 1H, CHOH), 6,71 (d, ³J = 8,2, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,10 (d, ³J = 8,2, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,30-7,35 (m, 3H, NH, FluH-3, FluH-8), 7,42 (t, ³J = 7,4, 2H, FluH-4, FluH-7), 7,70 (d, ³J = 7,4, 2H, FluH-2, FluH-9), 7,89 (d, ³J = 7,4, 2H, FluH-5, FluH-6), 9,33 (s, 1H, Ph-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 46,7 (CHCH₂OCO), 48,5 (NHCH₂CHOH), 65,4 (CHCH₂OCO), 71,1 (CHOH), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 120,1 (2C, FluC-5, FluC-6), 125,3 (2C, FluC-2, FluC-9), 127,1 (2C, FluC-3, FluC-8), 127,2 (2C, PhC-2, PhC-6), 127,6 (2C, FluC-4, FluC-7), 133,9 (PhC-1), 140,7 (2C, FluC-5a, FluC-5b), 143,9 (FluC-1a/FluC-9a), 144,0 (FluC-1a/FluC-9a), 156,2 (COONH), 156,4 (PhC-4).

HRMS ber. 398,1363, gef. 398,1367 ([M+H]⁺)
Schmp. 120-125 °C (Zers.)
R_f (DC) 0,41 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)
t_R (HPLC) 11,63 min (5–95 % B in A, 0-20 min, RP-Amid Säule)

***N*-Pivaloyl-D,L-octopamin**



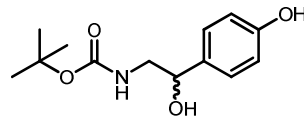
84

1,14 g (6,00 mmol) D,L-Octopamin-hydrochlorid und 1,95 g (6,00 mmol) Cs₂CO₃ wurden in 100 ml DMF gelöst und in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. 2,43 ml (12,00 mmol) Pivalinsäureanhydrid wurden langsam zugetropft und die Reaktion wurde 3 d bei RT gerührt. Das Cs₂CO₃ wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in AcOEt gelöst und mit dest. H₂O und gesätt. NaCl-Lsg gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels Flash-SC (*n*-Hexan/AcOEt = 5/1 bis reines AcOEt) gereinigt. Es resultierten 0,59 g (2,50 mmol, 42 %) **84** als harziger farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,05 (s, 9H, CH₃), 3,07-3,26 (m, 2H, CH₂), 4,51-4,56 (m, 1H, CHOH), 5,29 (d, ³J = 3,9, 1H, CHOH), 6,70 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,10 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,27 (t, ³J = 5,3, 1H, NH), 9,21 (s, 1H, Ph-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,4 (C(CH₃)₃), 38,0 (C(CH₃)₃), 47,2 (CH₂), 71,0 (CHOH), 114,7 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,1 (2C, PhC-2, PhC-6), 134,1 (PhC-1), 156,3 (PhC-4), 177,5 (COC(CH₃)₃).

HRMS ber. 238,1438, gef. 238,1437 ([M+H]⁺)
R_f (DC) 0,23 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1), 0,15 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)
t_R (HPLC) 5,63 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-D,L-octopamin****85**

189,64 mg (1,00 mmol) D,L-Octopamin-hydrochlorid und 139,38 μ l (1,00 mmol) Et₃N wurden in 50 ml EtOH gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. 261,90 mg (1,20 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat wurden portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung wurde anschließend 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml AcOEt gelöst und mit 30 ml NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach der Lyophilisierung resultierten 242,9 mg (0,96 mmol, 96 %) **85** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,35 (s, 9H, CH₃), 2,92-3,11 (m, 2H, CH₂), 4,46 (t, ³J = 6,2, 1H, CHOH), 5,16 (bs, 1H, CHOH), 6,59 (t, ³J = 5,1, 1H, NH), 6,69 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,09 (d, ³J = 8,3, 2H, PhH-2, PhH-6), 9,21 (bs, 1H, Ph-OH).

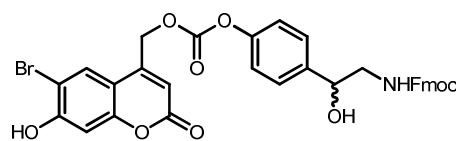
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 28,4 (CH₃), 48,2 (CH₂), 71,2 (CHOH), 77,5 (C(CH₃)₃), 114,7 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,1 (2C, PhC-2, PhC-6), 133,9 (PhC-1), 155,6 (NCOO), 156,3 (PhC-4).

HRMS ber. 276,1206, gef. 276,1209 ([M+Na]⁺)

Schmp. 148 °C

R_f (DC) 0,47 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1), 0,38 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 7,30 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

1-[4-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarboxy]oxyphenyl]-2-[(fluoren-9-yl)methoxycarbonylamino]ethanol**86**

210,05 mg (0,77 mmol) **16** wurden nach Methode B in innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 0,75 Äq *N*-(Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl-octopamin (**83**) innerhalb von 24 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 31,06 min) wurden 87,1 mg (0,12 mmol, 20 %) **86** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,15 (t, ³J = 5,5, 2H, NHCH₂), 4,16-3,33 (m, 3H, FluCHCH₂O, FluCHCH₂O), 4,63 (t, ³J = 6,1, 1H, CHOH), 5,52 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,33 (s, 1H, CumH-3), 6,94 (s, 1H, CumH-8), 7,24 (d, ³J = 8,5, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,29-7,44 (m, 7H, NH, PhH-3, PhH-5, FluH-3, FluH-4, FluH-7, FluH-8), 7,69 (d, ³J = 7,7, 2H, FluH-2, FluH-9), 7,89 (d, ³J = 7,4, 2H, FluH-5, FluH-6), 7,97 (s, 1H, CumH-5), 11,60 (bs, 1H, Cum-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 46,7 (FluCHCH₂CO₂), 48,3 (NCH₂), 65,2 (Cum-CH₂O), 65,3 (FluCHCH₂CO₂), 70,8 (CHOH), 103,2 (CumC-8), 106,3 (CumC-6), 109,9 (CumC-3), 110,4 (CumC-4a), 120,1 (2C, FluC-5, FluC-6), 120,7 (2C, PhC-2, PhC-6), 125,2 (2C, FluC-2, FluC-9), 127,0 (2C, FluC-3, FluC-8), 127,3 (PhC-1), 127,6 (2C, FluC-4, FluC-7), 128,7 (CumC-5), 140,7 (2C, FluC-5a, FluC-5b), 141,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 143,9 (2C, FluC-1a, FluC-9a), 148,6 (CumC-4), 149,6 (PhC-4), 152,5 (OCO₂), 153,9 (CumC-7/CumC-8a), 156,2 (Cum-CH₂OCO), 157,6 (CumC-7/CumC-8a), 159,5 (CumC-2).

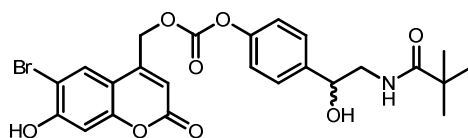
HRMS ber. 672,0864; gef. 672,0861 ([M+H]⁺)

Schmp. 111 °C

***R_f* (DC)** 0,50 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

***t_R* (HPLC)** 15,11 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

1-{4-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarboxy]oxyphenyl}-2-(pivaloyl-amino)ethanol



87

1084,24 mg (4,0 mmol) **16** wurden nach Methode B in DMF innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 0,5 Äq *N*-Pivaloyl-octopamin (**84**) innerhalb von 48 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 200/0 bis 200/10) wurden 618,7 mg (1,16 mmol, 58 %) **87** als hellgelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 1,04 (s, 9H, CH₃), 3,14-3,30 (m, 2H, NHCH₂), 4,68 (t, ³*J* = 6,1, 1H, NHCH₂CHOH), 5,52 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,33 (s, 1H, CumH-3), 6,93 (s, 1H, CumH-8), 7,24 (d, ³*J* = 8,5, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,37 (d, ³*J* = 8,6, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,37 (m, 1H, NH), 7,96 (s, 1H, CumH-5), 11,56 (bs, 1H, Cum-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 27,4 (C(CH₃)₃), 38,0 (C(CH₃)₃), 46,9 (NCH₂), 65,2 (Cum-CH₂O), 70,7 (CHOH), 103,2 (CumC-8), 106,3 (CumC-6), 109,9 (CumC-3), 110,4 (CumC-4a), 120,6 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,3 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,7 (CumC-5), 142,0 (PhC-1), 148,6 (CumC-4), 149,6 (PhC-4), 152,5 (OCO₂), 153,9 (CumC-7/CumC-8a), 157,6 (CumC-7/CumC-8a), 159,5 (CumC-2), 177,6 (HNCOC(CH₃)₃).

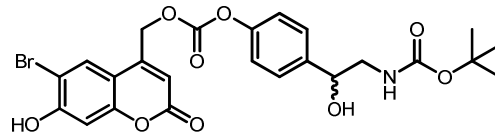
HRMS ber. 534,0758; gef. 534,0745 ([M+H]⁺)

Schmp. 84 °C

***R_f* (DC)** 0,49 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1), 0,09 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

***t_R* (HPLC)** 11,18 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

1-{4-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarboxy]oxyphenyl}-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]ethanol

**88**

a) 271,06 mg (1,0 mmol) **16** wurden nach Methode B in DMF innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 0,75 Äq *N*-Boc-octopamin (**85**) innerhalb von 24 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 200/0 bis 200/9) wurden 152,1 mg (0,28 mmol, 37 %) **88** als farbloser Feststoff erhalten.

b) 271,06 mg (1,0 mmol) **16** wurden nach Methode B in DMF innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq *N*-Boc-octopamin (**85**) innerhalb von 48 h bei 40 °C umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t*_R = 38,18 min) wurden 231 mg (0,42 mmol, 42 %) **88** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,35 (s, 9H, CH₃), 2,99-3,17 (m, 2H, NHCH₂), 4,60 (t, ³J = 6,0, 1H, CHOH), 5,52 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,33 (s, 1H, CumH-3), 6,73 (t, ³J = 5,2, 1H, NH), 6,93 (s, 1H, CumH-8), 7,24 (d, ³J = 8,5, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,37 (d, ³J = 8,5, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,97 (s, 1H, CumH-5), 11,54 (bs, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 28,2 (C(CH₃)₃), 48,0 (NCH₂), 65,2 (Cum-CH₂O), 70,9 (CHOH), 77,6 (C(CH₃)₃), 103,2 (CumC-8), 106,3 (CumC-6), 109,9 (CumC-3), 110,4 (CumC-4a), 120,6 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,3 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,7 (CumC-5), 141,8 (PhC-1), 148,6 (CumC-4), 149,6 (PhC-4), 152,5 (OCO₂), 153,9 (CumC-7/CumC-8a), 155,6 (NCO₂), 157,6 (CumC-7/CumC-8a), 159,5 (CumC-2).

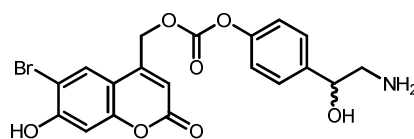
HRMS ber. 572,0527; gef. 572,0537 ([M-Na]⁺)

Schmp. 71 °C

R_f (DC) 0,39 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1), 0,10 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 12,44 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

1-{4-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarboxy]phenyl}-2-aminoethanol [*O*¹-BHC Moc-caged Octopamin]

**89**

a) 20,40 mg (0,03 mmol) **86** und 2,97 µl (0,03 mmol) Piperidin wurden in 20 ml DMF 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und das erhaltene Produkt

mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 12,88 min) gereinigt. Es wurden 8,10 mg (0,02 mmol, 59 %) **89** als hellgelber Feststoff erhalten.

b) 50 mg (0,09 mmol) **88** wurden in 10 ml einer 2N HCl-Lsg. in Dioxan gegeben und 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 12,88 min) gereinigt. Es wurden 35,2 mg (0,08 mmol, 72 %) **89** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 2,87 (t, ³J = 11,2, 1H, NH₂CH₂), 3,07 (d, ³J = 12,2, 1H, NH₂CH₂), 4,82 (d, ³J = 9,5, 1H, CHOH), 5,23 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,15 (d, ³J = 3,5, 1H, CHO_H), 6,32 (s, 1H, CumH-3), 6,95 (s, 1H, CumH-8), 7,32 (d, ³J = 8,5, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,47 (d, ³J = 8,5, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,93 (bs, 2H, NH₂), 7,96 (s, 1H, CumH-5), 11,69 (bs, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 45,4 (NH₂CH₂), 65,3 (Cum-CH₂O), 68,6 (CHO_H), 103,2 (CumC-8), 106,3 (CumC-6), 109,9 (CumC-3), 110,3 (CumC-4a), 121,2 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,3 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,7 (CumC-5), 139,9 (PhC-1), 148,6 (CumC-4), 150,2 (PhC-4), 152,5 (OCO₂), 153,9 (CumC-7/CumC-8a), 157,7 (CumC-7/CumC-8a), 159,5 (CumC-2).

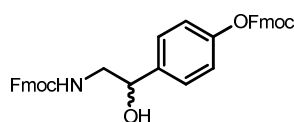
Elementaranalyse C₁₉H₁₆BrNO₇: ber. C 50,69 %, H 3,58 %, N 3,11 %;
gef. C 50,60 %, H 3,82 %, N 3,14 %

HRMS ber. 450,0183; gef. 450,0184 ([M+H]⁺)

Schmp. 97 °C

t_R (HPLC) 6,54 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N,O*¹-Bis[(fluoren-9-yl)methoxycarbonyl]-D,L-octopamin**



90

1,21 g (6,38 mmol) D,L-Octopamin-hydrochlorid und 1,65 ml (12,76 mmol) DIPEA wurden in 40 ml trockenem CH₂Cl₂ gelöst. Anschließend wurden 1,98 g (7,66 mmol) FmocCl portionsweise zugegeben und die Reaktion 1 h bei RT gerührt. Es wurde filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 200/0 bis 200/5) gereinigt. Es resultierten 1,44 g (2,42 mmol, 38 %) **90** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,14 (t, ³J = 5,7, 2H, NHCH₂), 4,18–4,33 (m, 3H, NHOCOCH₂CH), 3,38 (t, ³J = 5,7, 1H, CO₃CH₂CH), 4,62 (q, ³J = 4,8, 1H, CHOH), 4,67 (d, ³J = 5,9, 2H, CO₃CH₂CH), 5,51 (d, ³J = 4,3, 1H, CHO_H), 7,09 (d, ³J = 8,0, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,30–7,47 (m, 11H, PhH-2, PhH-6, NH, FluH-3, FluH-3', FluH-4, FluH-4', FluH-7, FluH-7', FluH-8, FluH-8'), 7,69 (d, ³J = 7,3, 4H, FluH-2, FluH-2', FluH-9, FluH-9'), 7,88 (d, ³J = 7,6, 2H, FluH-5, FluH-6), 7,88 (d, ³J = 7,6, 2H, FluH-5', FluH-6').

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 46,3 (FluC-1), 46,7 (FluC-1'), 48,3 (NHCH₂), 65,4 (FluC-1-CH₂OCO), 69,4 (FluC-CH₂OCO), 70,8 (CHOH), 120,1 [2C, (FluC-5, Flu-5')/(FluC-6/Flu-6')], 120,3 [2C, (FluC-5, Flu-5')/(FluC-6/Flu-6')], 120,7 (2C, PhC-3 PhC-5), 125,0 [2C, (FluC-2, Flu-2')/(FluC-9/Flu-9')], 127,1, 127,3, 127,6, 127,9 (PhC-2, PhC-6, FluC-3/Flu-3', FluC-4/Flu-4', FluC-7/Flu-7', FluC-8/Flu-8'), 140,8 (2C, FluC-5a, FluC-5b), 140,9 (2C, FluC-5'a, FluC-5'b), 141,6 (PhC-1), 143,2 (2C, FluC-1'a, FluC-9'a), 143,91 (FluC-1a/FluC-9a), 143,94 (FluC-1a/FluC-9a), 149,6 (PhC-4), 153,0 (OCOO), 156,3 (NHOCO).

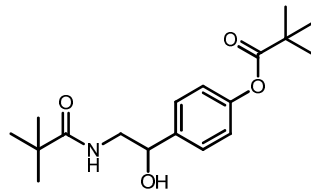
HRMS ber. 598,2224, gef. 598,2236 ([M+H]⁺)

Schmp. 157 °C

R_f (DC) 0,13 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 16,42 min (5–95 % B in A, 0–20 min, RP-Amid Säule)

***N,O*¹-Bis(pivaloyl)-D,L-octopamin**



91

1,14 g (6,00 mmol) D,L-Octopamin-hydrochlorid und 1,95 g (6,00 mmol) Cs₂CO₃ wurden in 100 ml DMF gelöst. Die Reaktionsmischung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und 3,04 ml (15,00 mmol) Pivalinsäureanhydrid wurden langsam zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionslösung 4 h bei RT gerührt. Das Cs₂CO₃ wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in AcOEt gelöst und mit dest. H₂O und gesätt. NaCl-Lsg gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde mittels Flash-SC (Hex/AcOEt = 5/1 bis 1/1) gereinigt. Es resultierten 0,91 g (2,82 mmol, 47 %) **91** als farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 1,05 (s, 9H, NHCOC(CH₃)₃), 1,30 (s, 9H, COC(CH₃)₃), 3,12–3,29 (m, 2H, CH₂), 4,67 (q, $^3J = 5,6$, 1H, CHOH), 5,48 (d, $^3J = 4,2$, 1H, CHOH), 7,03 (d, $^3J = 8,4$, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,33 (d, $^3J = 8,4$, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,38 (t, $^3J = 5,4$, 1H, NH).

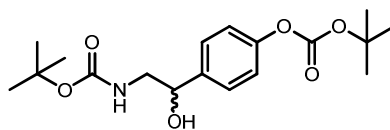
$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 26,8 (HNCOC(CH₃)₃), 27,4 (OCOC(CH₃)₃), 37,9 (OCOC(CH₃)₃), 38,5 (NHCOC(CH₃)₃), 70,7 (CHOH), 121,0 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,0 (2C, PhC-2, PhC-6), 141,2 (PhC-1), 149,6 (PhC-4), 176,4 (OCOC(CH₃)₃), 177,5 (HNCOC(CH₃)₃).

HRMS ber. 322,2013, gef. 322,2020 ([M+H]⁺)

Schmp. 150 °C

R_f (DC) 0,46 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 11,15 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N,O*¹-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-D,L-octopamin****92**

189,64 mg (1,00 mmol) D,L-Octopamin-hydrochlorid, 523,80 mg (2,40 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat und 139,4 μ l Et₃N wurden in 50 ml EtOH gelöst und 36 h bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 250/0 bis 240/10) gereinigt. Es resultierten 227 mg (0,64 mmol, 64 %) **92** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,35 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,49 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,97-3,15 (m, 2H, CH₂), 4,59 (t, ³J = 6,0, 1H, CHOH), 5,38 (bs, 1H, CHOH), 6,71 (t, ³J = 5,3, 1H, NH), 7,12 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,33 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-2, PhH-6).

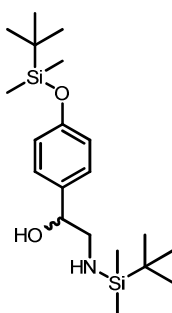
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,3 (C(CH₃)₃), 28,2 (C(CH₃)₃), 48,1 (CH₂), 70,9 (CHOH), 77,6 (C(CH₃)₃), 83,1 (C(CH₃)₃), 120,9 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,1 (2C, PhC-2, PhC-6), 141,3 (PhC-1), 149,6 (PhC-4), 151,4 (OCOOOC(CH₃)₃), 155,6 (HNCOOOC(CH₃)₃).

HRMS ber. 376,1731, gef. 376,1735 ([M+Na]⁺)

Schmp. 132 °C

R_f (DC) 0,81 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1), 0,70 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 14,05 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

1-Hydroxy-1-[4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl]-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)ethylamin**93**

1,06 mg (5,59 mmol) D,L-Octopamin-hydrochlorid, 3,12 ml (22,37 mmol) Et₃N und 3,37 g (22,37 mmol) TBDMSCl wurden in 50 ml MeCN gegeben und 70 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂ gelöst und zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Die erhaltene organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach der Lyophilisierung resultierten 1,61 g (4,22 mmol, 75 %) **93** als farbloser Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ -0,16 (s, 3H, SiCH₃), 0,03 (s, 3H, SiCH₃), 0,17 (s, 6H, PhOSi(CH₃)₂), 0,81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0,93 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 2,65-2,77 (m, 2H, NCH₂), 3,95 (bs, 1H, OH), 4,64-4,68 (m, 1H, OCH), 6,80 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,19 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-2, PhH-6).

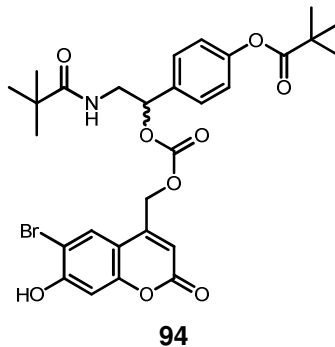
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ -4,8 (CH₃), -4,6 (CH₃), 17,8(C(CH₃)₃), 17,9 (C(CH₃)₃), 25,5 (C(CH₃)₃), 25,7 (C(CH₃)₃), 49,1 (CH₂NH₂), 74,5 (CHOH), 119,4 (2C, C-3, C-5), 127,4 (2C, C-2, C-6), 135,4 (C-1), 154,4 (C-4).

HRMS ber. 382,2598, gef. 382,2600 ([M+H]⁺)

R_f (DC) 0,25 (CH₂Cl₂/MeOH = 19,5/0,5)

t_R (HPLC) 15,69 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

1-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyloxy]-2-pivaloyl-amino-1-[4-(pivaloyloxy)phenyl]ethan



162,64 mg (0,60 mmol) **16** wurden nach Methode B in innerhalb von 8 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq *N,O*-Bis-pivaloyl-octopamin (**91**) innerhalb von 5 d umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 31,84 min) wurden 36,3 mg (0,06 mmol, 10 %) **94** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,02 (s, 9H, NHCO(C(CH₃)₃), 1,30 (s, 9H, OCOC(CH₃)₃), 3,44 (t, ³J = 5,9, 2H, NHCH₂), 5,39 (d, ³J = 7,0, 2H, Cum-CH₂O), 5,75 (t, ³J = 6,4, 1H, CHOH), 6,21 (s, 1H, CumH-3), 6,91 (s, 1H, CumH-8), 7,13 (d, ³J = 7,1, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,39 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,79 (t, ³J = 5,4, H, NH), 7,88 (s, 1H, CumH-5), 11,52 (bs, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 26,7 (OCOC(CH₃)₃), 27,2 (NHCHC(CH₃)₃), 38,0 (NHCHC(CH₃)₃), 38,5 (OCOC(CH₃)₃), 43,7 (NHCH₂), 64,6 (Cum-CH₂O), 77,7 (CHOH), 103,2 (CumC-8), 106,2 (CumC-6), 109,6 (CumC-3), 110,3 (CumC-4a), 121,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,6 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,6 (CumC-5), 134,9 (PhC-1), 149,0 (CumC-4), 150,7 (PhC-4), 153,5 (OCO₂), 153,9 (CumC-7/CumC-8a), 157,5 (CumC-7/CumC-8a), 159,4 (CumC-2), 176,3 (COOPh), 177,8 (CONHCH₂).

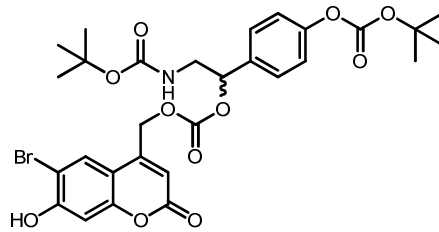
HRMS ber. 618,1333; gef. 618,1330 ([M+H]⁺)

Schmp. 110–114 °C (Zers.)

R_f (DC) 0,53 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1), 0,00 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 15,67 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

1-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyloxy]-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-1-[4-(*tert*-butoxycarbonyloxy)phenyl]ethan



95

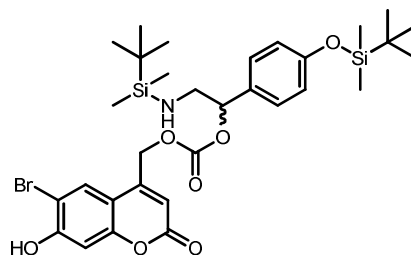
271,06 mg (1,0 mmol) **16** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 5 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 0,75 Äq *N,O*¹-Bis-Boc-octopamin (**92**) innerhalb von 2 d bei 40 °C umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t*_R = 33,74 min) wurden 105 mg (0,16 mmol, 21 %) **95** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,35 (s, 9H, NHCOC(CH₃)₃), 1,49 (s, 9H, OCOC(CH₃)₃), 3,27-3,37 (m, 2H, NHCH₂), 5,40 (d, ⁴*J* = 3,6, 2H, Cum-CH₂O), 5,63-5,67 (m, 1H, CHOH), 6,21 (s, 1H, CumH-3), 6,91 (s, 1H, CumH-8), 7,18 (t, ³*J* = 5,3, 1H NH), 7,21 (d, ³*J* = 8,4, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,40 (d, ³*J* = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,87 (s, 1H, CumH-5), 11,51 (s, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,2 (OCO₂C(CH₃)₃), 28,1 (NHOCOC(CH₃)₃), 44,7 (NHCH₂), 64,5 (Cum-CH₂O), 78,0 (OCO₂C(CH₃)₃), 78,2 (CHOH), 83,3 (NHOCOC(CH₃)₃), 103,2 (CumC-8), 106,2 (CumC-6), 109,3 (CumC-4a), 110,3 (CumC-6), 121,6 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,7 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,6 (CumC-5), 135,1 (PhC-1), 149,1 (CumC-4), 150,6 (PhC-4), 151,1 (OCONH/OCO₂Ph), 153,3 (Cum-CH₂OCO₂), 153,8 (CumC-7/CumC-8a), 155,6 (OCONH/OCOOPh), 157,5 (CumC-7/CumC-8a), 159,4 (CumC-2).

| | |
|------------------------------------|--|
| HRMS | ber. 672,1051; gef. 672,1059 ([M+Na] ⁺) |
| Schmp. | 110 °C |
| <i>R</i>_f (DC) | 0,78 (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 19/1), 0,52 (<i>n</i> -Hexan/AcOEt = 1/1) |
| <i>t</i>_R (HPLC) | 16,66 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec) |

1-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyloxy]-2-[(*tert*-butyldimethylsilyl)amino]-1-[4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl]ethan



96

251,7 mg (0,65 mmol) **16** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 5 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann

nach Methode D mit 0,75 Äq 1-Hydroxy-1-[4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl]-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)ethylamin (**93**) innerhalb von 75 min umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 100/1 bis 50/1) wurden 250 mg (0,37 mmol, 71 %) **96** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ -0,15 (s, 3H, CH₃), -0,03 (s, 3H, CH₃), 0,16 (s, 6H, CH₃), 0,79 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0,93 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3,05-3,14 (m, 2H, NCH₂), 4,70 (t, ³*J* = 6,0, 1H, CHOH), 5,23 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,20 (s, 1H, CumH-3), 6,81 (d, ³*J* = 8,3, 2H, PhH-2, PhH-6), 6,91 (s, 1H, CumH-8), 7,17 (d, ³*J* = 8,3, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,58 (t, ³*J* = 5,7, 1H, NH), 7,88 (s, 1H, CumH-5), 11,50 (s, 1H, Cum-OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ -5,0 (CH₃), -4,6 (CH₃), 17,8(C(CH₃)₃), 17,9 (C(CH₃)₃), 25,5 (C(CH₃)₃), 25,6 (C(CH₃)₃), 49,1 (CH₂NH₂), 60,8 (CH₂O), 72,9 (CHOH), 103,1 (CumC-8), 106,3 (CumC-6), 108,7 (CumC-3), 110,5 (CumC-4a), 119,4 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,2 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,4 (CumC-5), 135,5 (PhC-1), 151,0 (CumC-4), 153,8 (CumC-7/CumC-8a), 154,3 (PhC-4), 155,4 (OCO₂), 157,5 (CumC-7/CumC-8a), 159,7 (CumC-2).

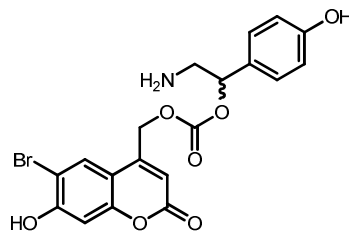
ESI-MS ber. 678,2; gef. 678,2 ([M+H]⁺)

Schmp. 80-83 °C

R_f (DC) 0,89 (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1), 0,52 (CH₂Cl₂/MeOH = 19,5/0,5)

t_R (HPLC) 21,11 min (50–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

1-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyloxy]-2-amino-1-(4-hydroxyphenyl)ethan [*O*²-BHCMOC-*caged* Octopamin]



97

68,0 mg (0,10 mmol) *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]-*N,O*-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*D,L*-octopamin (**96**) und 55,1 mg (0,2 mmol) TAS-F wurden in DMF gegeben und 30 min bei RT gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum wurde der Rückstand in 4,5 ml 2M HCl in Dioxan aufgenommen und 25 min bei RT gerührt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–60 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 30,89 min) wurden 16,7 mg (0,04 mmol, 37 %) **97** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,13 (t, ³*J* = 5,9, 2H, NCH₂), 4,51 (d, ³*J* = 2,8, 1H, CHO), 5,24 (s, 2H, Cum-CH₂), 6,22 (s, 1H, CumH-3), 6,71 (d, ³*J* = 8,3, 2H, PhH-2, PhH-6), 6,92 (s, 1H, CumH-8), 7,11 (d, ³*J* = 8,2, 2H, PhH-3, PhH-5), 7,51 (t, ³*J* = 5,5, 1H, NH), 7,87 (s, 1H, CumH-5), 9,23 (s, 1H, Ph-OH), 11,48 (s, 1H, Cum-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 48,6 (CH_2NH_2), 60,7 (CH_2O), 70,9 (CHOH), 103,2 (CumC-8), 106,2 (CumC-6), 108,4 (CumC-3), 110,5 (CumC-4a), 114,8 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,1 (2C, PhC-2, PhC-6), 128,4 (CumC-5), 133,8 (PhC-1), 151,2 (CumC-4), 153,8 (CumC-7/CumC-8a), 155,4 (OCO_2), 156,4 (PhC-4), 157,4 (CumC-7/CumC-8a), 159,7 (CumC-2).

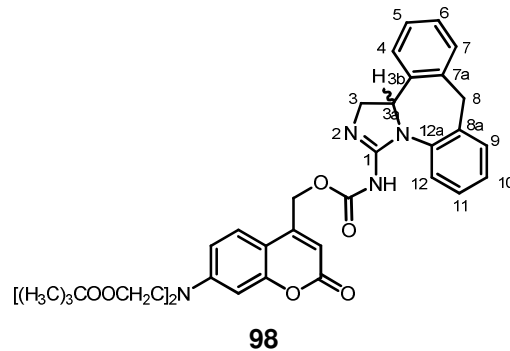
ESI-MS ber. 450,0183; gef. 450,0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 165-169 °C

R_f (DC) 0,31 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1$), 0,92 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$),
0,90 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1$ mit 1 % Et_3N)

t_R (HPLC) 7,57 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}-epinastin**



a) 83,89 mg (0,20 mmol) **12** wurden nach Methode A in CH_2Cl_2 mit 2,4 Äq. DIPEA und 2,4 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 2 h in den Aktivester *O*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl}-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**56**) überführt und dann nach Methode C in CH_2Cl_2 mit 1,2 Äq. Epinastin-hydrochlorid und 2,4 Äq. DMAP innerhalb von 22 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min^{-1} , Nucleodur C 18 ec, $t_R = 26,45$ min) wurden 13,9 mg (0,02 mmol, 10 %) **98** als hellgelber Feststoff erhalten.

b) 83,9 mg (0,20 mmol) **12** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 5,5 h in den Aktivester *O*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**59**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. Epinastin-hydrochlorid innerhalb von 30 min umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (40–80 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min^{-1} , Nucleodur C 18 ec, $t_R = 27,90$ min) wurden 70,5 mg (0,1 mmol, 50 %) **98** als hellgelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 1,41 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3,72 (d, $^2J = 14,1$, 1H, H-8), 3,98 (t, $^3J = 9,6$, 1H, H-3), 4,21 (s, 4H, NCH_2CO), 4,64 (d, $^2J = 13,8$, 1H, H-8), 4,93 (t, $^3J = 9,8$, 1H, H-3), 5,45 (t, $^3J = 9,6$, 1H, H-3a), 5,60 (s, 2H, Cum- CH_2O), 6,27 (s, 1H, CumH-3), 6,50 (d, $^4J = 2,1$, 1H, CumH-8), 6,59 (dd, $^4J = 1,5$, $^3J = 9,0$, 1H, CumH-6), 7,26-7,64 (m, 9H, CumH-5, H-4, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12), 8,92 (bs, 1H, NH), 9,46 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 27,7 (CH₃), 36,64 (C-8), 52,3 (C-3), 53,5 (NCH₂CO), 60,2 (C-3a), 64,3 (Cum-CH₂O), 81,2 (C(CH₃)₃), 98,3 (CumC-8), 106,7 (CumC-3), 107,0 (CumC-4a), 109,2 (CumC-6), 125,5 (CumC-5), 127,1, 127,5, 128,1, 128,4, 128,6, 128,7, 130,3 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-12), 132,2 (C-7a/C-8a), 134,6 (C-3b), 135,2 (C-12a), 140,7 (C-7a/C-8a), 149,3 (CumC-4), 150,8 (OCON), 151,5 (CumC-7), 154,2 (C-1), 155,1 (CumC-8a), 160,4 (CumC-2), 168,8 (OCOC(CH₃)₃).

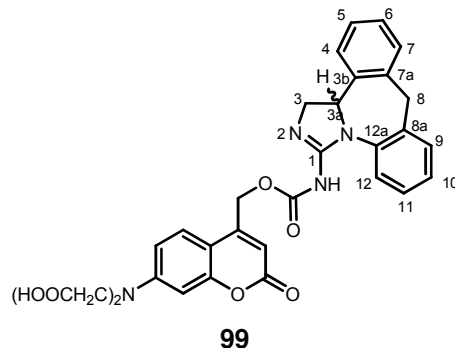
HRMS ber. 695,3075, gef. 695,3096 ([M+H]⁺)

Schmp. 87-92 °C

R_f (DC) 0,46 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 14,61 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}epinastin (BCMCMOC-caged Epinastin)**



49 mg (0,07 mmol) **98** wurden nach Methode E innerhalb von 1,5 h hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (5–60 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 15,72 min). Es wurden 31,9 mg (0,05 mmol, 77 %) **99** als hellgelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 3,72 (d, $^2J = 14,2$, 1H, H-8), 4,00 (t, $^3J = 9,6$, 1H, H-3), 4,24 (s, 4H, NCH₂CO), 4,65 (d, $^2J = 14,0$, 1H, H-8), 4,93 (t, $^3J = 9,7$, 1H, H-3), 5,45 (t, $^3J = 9,6$, 1H, H-3a), 5,59 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,26 (s, 1H, CumH-3), 6,51 (d, $^4J = 1,8$, 1H, CumH-8), 6,62 (dd, $^4J = 1,8$, $^3J = 9,0$, 1H, CumH-6), 7,27-7,63 (m, 9H, CumH-5, H-4, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12), 8,91 (bs, 1H, NH), 9,44 (bs, 1H, NH), 12,99 (bs, 2H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 36,7 (C-8), 52,1 (C-3), 52,9 (NCH₂CO), 60,2 (C-3a), 64,2 (Cum-CH₂O), 98,1 (CumC-8), 106,5 (CumC-3), 106,8 (CumC-4a), 109,2 (CumC-6), 125,5, 127,1, 127,5, 128,1, 128,4, 128,6, 128,8 130,29, 130,33 (CumC-5, C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-12), 132,2 (C-7a/C-8a), 134,6 (C-3b), 135,2 (C-12a), 140,7 (C-7a/C-8a), 149,3 (CumC-4), 150,8 (OCON), 151,6 (CumC-7), 154,2 (C-1), 155,2 (CumC-8a), 160,4 (CumC-2), 171,4 (COOH).

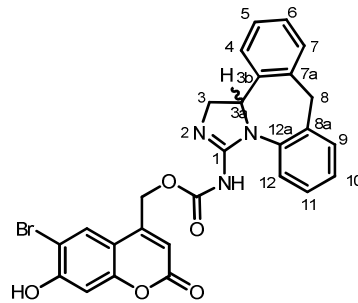
Elementaranalyse C₃₁H₂₆N₄O₈ (1 TFA): ber. C 56,90 %, H 3,91 %, N 8,04 %, gef. C 56,44 %, H 3,99 %, N 8,43 %

HRMS ber. 583,1823, gef. 583,1876 ([M+H]⁺)

Schmp. 148 °C

t_R (HPLC) 7,89 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]epinastin (BHCmoc-caged Epinastin)**

**100**

67,8 mg (0,25 mmol) **16** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 5,5 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. Epinastin-hydrochlorid innerhalb von 1 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t_R* = 25,53 min) wurden 43,4 mg (0,08 mmol, 32 %) **100** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,72 (d, ²*J* = 14,1, 1H, H-8), 4,01 (t, ³*J* = 9,5, 1H, H-3), 4,64 (d, ²*J* = 13,8, 1H, H-8), 4,94 (t, ³*J* = 9,8, 1H, H-3), 5,46 (t, ³*J* = 9,6, 1H, H-3a), 5,65 (s, 2H, CH₂O), 6,42 (s, 1H, CumH-3), 6,96 (s, 1H, CumH-8), 7,27-7,62 (m, 8 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12), 8,02 (s, 1H, CumH-5), 8,92 (bs, 1H, NH), 9,46 (bs, 1H, NH), 11,81 (bs, 1H, OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 36,7 (C-8), 52,1 (C-3), 60,2 (C-3a), 64,1 (Cum-CH₂O), 103,2 (CumC-8), 106,4 (CumC-6), 109,2 (CumC-3), 110,1 (CumC-4a), 127,1, 127,5, 128,1, 128,4, 128,7, 128,8, 130,3 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-12), 132,2 (C-7a/C-8a), 134,6 (C-3b/C-12a), 135,1 (C-3b/C-12a), 140,7 (C-7a/C-8a), 148,8 (CumC-4), 150,7 (OCON), 153,8 (CumC-8a), 154,2 (C-1), 157,7 (CumC-7), 159,7 (CumC-2).

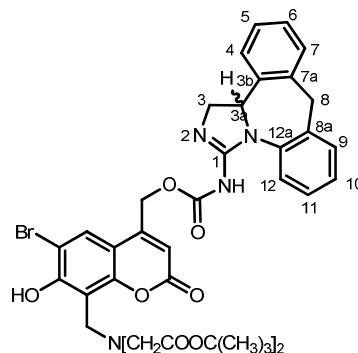
HRMS ber. 546,0659; gef. 546,0677 ([M+H]⁺)

Schmp. 118,7 °C

***R_f* (DC)** 0,13 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1), 0,56 (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1)

***t_R* (HPLC)** 10,17 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}epinastin**

**101**

a) 264,2 mg (0,5 mmol) **17** wurden nach Methode B in DMF innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-{{8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**61**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. Epinastinhydrochlorid innerhalb von 30 min umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (40–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 21,32$ min) wurden 81 mg (0,10 mmol, 20 %) **101** als farbloser Feststoff erhalten.

b) 132,1 mg (0,25 mmol) **17** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-{{8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**61**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. Epinastinhydrochlorid innerhalb von 45 min umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (50–80 % B in A, 0–60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 24,6$ min) wurden 49,9 mg (0,06 mmol, 25 %) **101** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,43 (s, 18H, C(CH₃)₃), 3,47 (s, 4H, NCH₂CO), 3,73 (d, ²J = 14,1, 1H, H-8), 4,01 (t, ³J = 9,5, 1H, H-3), 4,18 (s, 2H, CH₂NCH₂CO), 4,65 (d, ²J = 13,8, 1H, H-8), 4,94 (t, ³J = 9,6, 1H, H-3), 5,50 (t, ³J = 9,6, 1H, H-3a), 5,66 (s, 2H, CH₂O), 6,43 (s, 1H, CumH-3), 7,27–7,62 (m, 8 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12), 8,02 (s, 1H, CumH-5), 8,92 (s, 1H, NH), 9,47 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 27,7 (C(CH₃)₃), 36,7 (C-8), 47,8 (Cum-CH₂N), 52,1 (C-3), 54,7 (NCH₂CO), 60,2 (C-3a), 64,2 (Cum-CH₂O), 81,6 (C(CH₃)₃), 106,3 (CumC-6), 108,9 (CumC-3), 109,9 (CumC-4a), 110,2 (CumC-8), 127,5 (CumC-5), 127,1, 128,1, 128,4, 128,7, 128,8, 130,3 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-12), 132,2 (C-7a/C-8a), 134,6 (C-3b), 135,2 (C-12a), 140,7 (C-7a/C-8a), 149,0 (CumC-4), 150,7 (OCON), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 154,2 (C-1), 157,5 (CumC-7/CumC-8a), 159,1 (CumC-2), 169,9 (OCOC(CH₃)₃).

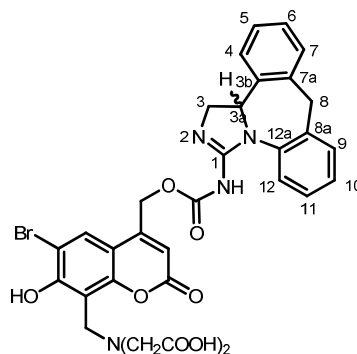
HRMS ber. 803,2286, gef. 803,2293 ([M+H]⁺)

Schmp. 91–94 °C

R_f (DC) 0,49 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 16,11 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}methoxy-carbonyl}epinastin (BBHCMOC-*caged* Epinastin)**



102

41,50 mg (0,05 mmol) **101** wurden nach Methode E hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 15,45$ min). Nach der Lyophilisierung wurden 35,00 mg (0,05 mmol, 98 %) **102** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,52 (s, 4H, NCH₂CO), 3,73 (d, ²J = 14,1, 1H, H-8), 4,01 (t, ³J = 9,5, 1H, H-3), 4,20 (s, 2H, CH₂NCH₂CO), 4,65 (d, ²J = 14,1, 1H, H-8), 4,94 (t, ³J = 9,8, 1H, H-3), 5,46 (t, ³J = 9,6, 1H, H-3a), 5,65 (s, 2H, CH₂O), 6,43 (s, 1H, CumH-3), 7,27–7,62 (m, 8H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12), 8,0 (s, 1H, CumH-5), 8,92 (bs, 1H, NH), 9,47 (bs, 1H, NH), 12,74 (bs, 2H, COOH).

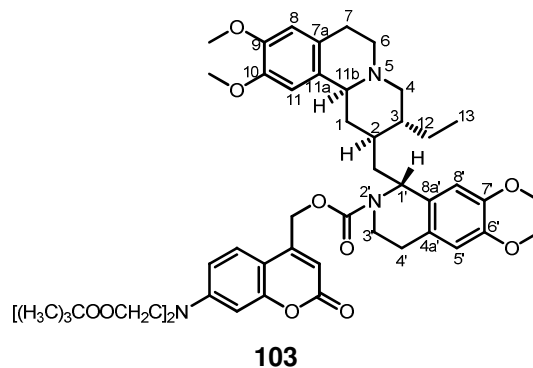
¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 36,7 (C-8), 47,9 (Cum-CH₂N), 52,1 (C-3), 53,5 (NCH₂CO), 60,2 (C-3a), 64,2 (Cum-CH₂O), 106,3 (CumC-6), 109,1 (CumC-3), 109,8 (CumC-4a), 110,3 (CumC-8), 127,4 (CumC-5), 127,0, 127,5, 128,1, 128,4, 128,6, 128,7, 130,3 (C-4, C-5, C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, C-12), 132,2 (C-7a/C-8a), 134,6 (C-3b), 135,1 (C-12a), 140,7 (C-7a/C-8a), 148,9 (CumC-4), 150,7 (OCON), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 154,2 (C-1), 157,6 (CumC-7/CumC-8a), 159,2 (CumC-2), 172,2 (COOH).

HRMS ber. 691,1034, gef. 691,1018 ([M+H]⁺)

Schmp. 139 °C

t_R (HPLC) 8,88 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

N-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}emetin^{35b}



a) 99,20 mg (0,24 mmol) **12** wurden nach Methode A in CH₂Cl₂ mit 1,2 Äq. DIPEA und 1,2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 0,5 h in den Aktivester *O*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl}-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**56**) überführt und dann nach Methode C in CH₂Cl₂ mit 1,2 Äq. Emetin-dihydrochlorid-hydrat und 3 Äq. DIPEA innerhalb von 12 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 33,60$ min) wurden 117,3 mg (0,13 mmol, 54 %) **103** als hellgelber Feststoff erhalten.

b) 104,9 mg (0,25 mmol) **12** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 5,5 h in den Aktivester *O*-{{7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**59**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. Emetin-dihydrochlorid-hydrat innerhalb von 1,5 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (40–80 % B in A, 0–60 min, 10,0 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, $t_R = 28,40$ min) wurden 147,4 mg (0,16 mmol, 64 %) **103** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 0,85 (t, ³J = 6,9, 3H, CH₂CH₃), 1,15-1,33 (m, 2H, H-1_{ax}, H-12), 1,41 (s, 18H, C(CH₃)₃), 1,41-1,62 (m, 4H, H-2, H-3, H-10', H-12), 2,15-2,18 (m, 1H, H-10'), 2,69-2,93 (m, 4H), 3,10-3,48 (m, 5H), 3,55 (s, 3H, OCH₃), 3,58-3,67 (m, 1H), 3,72 u. 3,74 (s, 9H, OCH₃), 4,05-4,12 (m, 1H, H-1'), 4,18-4,21 (m, 5H, Cum-NCH₂CO), 5,16-5,55 (m, 3H, Cum-CH₂O, H-10'), 5,98 (s, 1H, CumH-3), 6,40 (d, ⁴J = 1,6, 1H, CumH-8), 6,57 (dd, ⁴J = 1,8, ³J = 9,0, 1H, CumH-6), 6,72, 6,76, 6,80, 6,89 (s, 4H, H-5', H-8, H-8', H-11), 7,55 (d, ³J = 9,0, 1H, CumH-5), 9,81 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 9,9 (C-13), 21,7, 25,3, 27,5, 27,7 (C(CH₃)₃), 32,9, 35,4, 36,9, 37,1, 50,7, 50,9 (C-6, C-1'), 53,5 (NCH₂CO), 54,7, 55,3 (OCH₃), 55,46 (OCH₃), 55,50 (OCH₃), 55,7 (OCH₃), 57,5, 62,4 (Cum-CH₂O), 62,6, 81,1 (C(CH₃)₃), 98,2 (CumC-8), 105,6 (CumC-3), 106,8 (CumC-4a), 109,2 (CumC-6), 108,0, 110,6, 111,7, 112,1 (C-5', C-8', C-8, C-11), 123,4, 123,5, 125,0, 129,4 (C-4'a, C-8'a, C-7a, C-11a), 125,2 (CumC-5), 147,2, 147,6, 147,8, 148,3 (C-6', C-7', C-9, C-10), 151,5 (CumC-7), 152,0 (CumC-4), 154,5 (Cum-CH₂OCO), 155,0 (CumC-8a), 160,4 (CumC-2), 168,8 (OCOC(CH₃)₃).

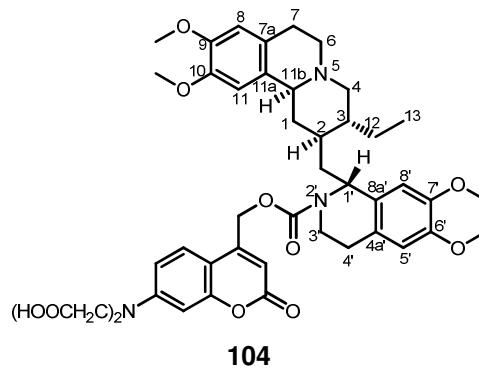
HRMS ber. 926,4803, gef. 926,4817 ([M+H]⁺)

Schmp. 143 °C

R_f (DC) 0,36 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 14,93 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methoxycarbonyl}emetin (BCMACMOC-caged Emetin)**



99 mg (0,11 mmol) **103** wurden nach Methode E innerhalb von 1 h hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 15,72 min). Es wurden 65,0 mg (0,07 mmol, 61 %) **104** als hellgelber Feststoffs erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 0,84 (t, ³J = 7,0, 3H, CH₂CH₃), 1,14-1,28 (m, 2H, H-1_{ax}, H-12), 1,42-1,62 (m, 4H, H-2, H-3, H-10', H-12), 2,12-2,18 (m, 1H, H-10'), 2,70-2,93 (m, 4H), 3,16-3,52 (m, 5H), 3,59 (s, 3H, OCH₃), 3,59-3,72 (m, 1H), 3,72 u. 3,74 (s, 9H, OCH₃), 3,92-4,05 (m, 1H, H-1'), 4,21 (bs, 5H, Cum-NCH₂CO), 5,22-5,51 (m, 3H, Cum-CH₂O, H-10'), 5,98 (s, 1H, CumH-3), 6,42 (s, 1H, CumH-8), 6,58-6,63 (m, 1H, CumH-6), 6,74, 6,78, 6,80, 6,89 (4xs, 4H, H-5', H-8, H-8', H-11), 7,55 (d, ³J = 8,6, 1H, CumH-5), 9,79 (bs, 1H, NH), 12,95 (bs, 2H, COOH).

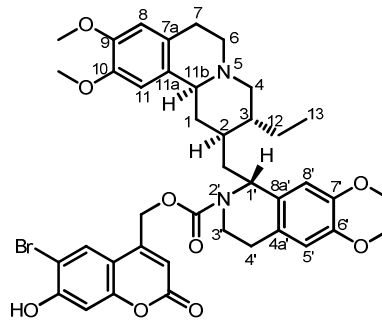
$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 9,9 ($\text{CH}_3\text{-13}$), 21,7, 25,3, 27,5, 33,0, 35,3, 36,9, 37,2, 50,8, 51,0 (C-6, C-1'), 52,8 (NCH_2CO), 55,3 (OCH_3), 55,49 (OCH_3), 55,54 (OCH_3), 55,7 (OCH_3), 57,5, 62,5 (Cum- CH_2O), 62,6, 98,1 (CumC-8), 105,7 (CumC-3), 106,7 (CumC-4a), 109,2 (CumC-6), 108,0, 110,6, 111,8, 112,1 (C-5', C-8', C-8, C-11), 123,4, 123,5, 125,0, 129,4 (C-4'a, C-8'a, C-7a, C-11a), 125,2 (CumC-5), 147,2, 147,6, 147,8, 148,4 (C-6', C-7', C-9, C-10), 151,6 (CumC-7), 151,9 (CumC-4), 154,5 (Cum- CH_2OCO), 155,1 (CumC-8a), 160,3 (CumC-2), 171,3 (COOH).

HRMS ber. 814,3546, gef. 814,3546 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 150 °C

t_{R} (HPLC) 8,72 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]emetin (BHC-MOC-caged Emetin)**



105

a) 500 mg (1,84 mmol) **16** wurden nach Methode A in THF mit 2 Äq. DIPEA und 1,5 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 1 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**57**) überführt und dann nach Methode C in DMF mit 1,2 Äq. Emetin-dihydrochlorid-hydrat und 2,4 Äq. DMAP innerhalb von 1 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-SC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 200/1$ bis $200/10$) wurden 868,3 mg (1,12 mmol, 61 %) **105** als farbloser Feststoff erhalten.

b) 135,53 mg (0,5 mmol) **16** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. Emetin-dihydrochlorid-hydrat innerhalb von 4 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels Flash-SC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 200/1$ bis $200/10$) wurden 258,4 mg (0,33 mmol, 67 %) **105** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 0,86 (t, $^3J = 6,7$, 3H, CH_3), 1,03 (t, $^3J = 6,0$, 1H, H-1 $_{\text{ax}}$), 1,23-1,31 (m, 1H, H-12), 1,35-1,53 (m, 2H, H-3, H-10'), 1,62-1,64 (m, 2H, H-2, H-12), 2,12-2,18 (m, 1H, H-10'), 2,76-2,93 (m, 4H), 3,11-3,35 (m, 5H), 3,50-3,68 (m, 1H), 3,56 (s, 3H, OCH_3), 3,72, 3,74 (s, 9H, OCH_3), 3,93-3,99 (m, 1H), 4,19-4,25 (m, 1H), 5,16-5,42 (m, 3H, Cum- CH_2O , H-10'), 6,14 (s, 1H, CumH-3), 6,71, 6,73, 6,80, 6,89 (s, 4H, H-5', PhH-8, PhH-8', PhH-11), 6,83 (s, 1H, CumH-8), 7,94 (s, 1H, CumH-5), 9,81 (bs, 1H, NH), 11,69 (bs, 1H, Cum-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 9,9 (C-13), 21,7, 25,2, 27,4, 32,7, 35,5, 37,0, 37,1, 50,8, 50,9 (C-6, PhC-1'), 55,2 (OCH₃), 55,5 (OCH₃), 55,6 (OCH₃), 55,7 (OCH₃), 57,6, 62,5, 62,6 (Cum-CH₂O), 103,1 (CumC-8), 106,3 (CumC-6), 107,8, 110,6, 111,8, 112,2 (C-5', C-8', C-8, C-11), 108,1 (CumC-3), 110,3 (CumC-4a), 123,3, 123,4, 124,9, 129,4 (C-4'a, C-8'a, C-7a, C-11a), 128,4 (CumC-5), 147,2, 147,6, 147,8, 148,3 (C-6', C-7', C-9, C-10), 151,4 (CumC-4), 153,8 (CumC-7/CumC-8a), 154,3 (Cum-CH₂OCO), 157,6 (CumC-7/CumC-8a), 159,5 (CumC-2).

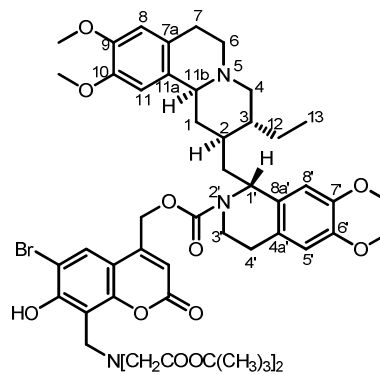
HRMS ber. 777,2381; gef. 777,2386 ([M+H]⁺)

Schmp. 170-178 °C

R_f (DC) 0,54 (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1)

t_R (HPLC) 10,72 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{{8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}methoxycarbonyl}emetin**



106

a) 101 mg (0,19 mmol) **17** wurden nach Methode A in THF mit 1,2 Äq. DIPEA und 1,2 Äq. Chlorameisensäure-4-nitrophenylester innerhalb von 1,5 h in den Aktivester *O*-{{8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}methyl}-*O*-*p*-nitrophenylcarbonat (**58**) überführt und dann nach Methode C in DMF mit 1,2 Äq. Emetin-dihydrochlorid-hydrat und 2,4 Äq. DMAP innerhalb von 1 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 33,28 min) wurden 88,3 mg (0,09 mmol, 45 %) **106** als farbloser Feststoff erhalten.

b) 528,39 mg (1,0 mmol) **17** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-{{8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl}methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**61**) überführt und dann nach Methode D mit 0,75 Äq. Emetin-dihydrochlorid-hydrat und 2 Äq. Et₃N innerhalb von 30 min umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 33,28 min) wurden 312,6 mg (0,03 mmol, 40 %) **106** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 0,86 (t, ³J = 6,9, 3H, CH₂CH₃), 1,03 (t, ³J = 6,1, 1H, H-1_{ax}), 1,20-1,30 (m, 1H, H-12), 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 1,42-1,62 (m, 4H, H-2, H-3, H-10', H-12), 2,12-2,18 (m, 1H, H-10'), 2,75-2,96 (m, 4H), 3,10-3,36 (m, 5H), 3,42 (s, 4H, Cum-CH₂NCH₂CO), 3,54 (s, 3H, OCH₃), 3,59-3,68 (m, 1H), 3,72 u. 3,74 (s, 9H, OCH₃), 3,94-4,07 (m, 3H, Cum-CH₂N, H-1'), 4,15-4,23 (m, 1H), 5,15-5,48 (m, 3H, Cum-CH₂O, H-10'), 6,17 (s, 1H, CumH-3), 6,69, 6,73, 6,79, 6,89 (s, 4H, H-5', H-8, H-8', H-11), 7,93 (s, 1H, CumH-5), 9,80 (bs, 1H, NH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 9,8 (H-13), 21,7, 25,3, 27,4, 27,7 (C(CH₃)₃), 32,60, 35,4, 36,9, 37,2, 47,8 (Cum-CH₂N), 50,8, 51,0 (C-6, C-1'), 54,7 (NCH₂CO), 55,1 (OCH₃), 55,4 (OCH₃), 55,5 (OCH₃), 55,7 (OCH₃), 57,6, 62,5 (Cum-CH₂O), 62,6, 81,5 (C(CH₃)₃), 106,3 (CumC-6), 107,8, 110,6, 111,6, 112,2 (C-5', C-8', C-8, C-11), 108,0 (CumC-3), 110,1 (CumC-8), 110,2 (CumC-4a), 123,3, 123,4, 124,9, 129,4 (C-4'a, C-8'a, C-7a, C-11a), 127,3 (CumC-5), 147,2, 147,6, 147,7, 148,3 (C-6', C-7', C-9, C-10), 151,6 (CumC-4), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 154,4 (Cum-CH₂OCO), 157,4 (CumC-7/CumC-8a), 159,1 (CumC-2), 169,8 (OCOC(CH₃)₃).

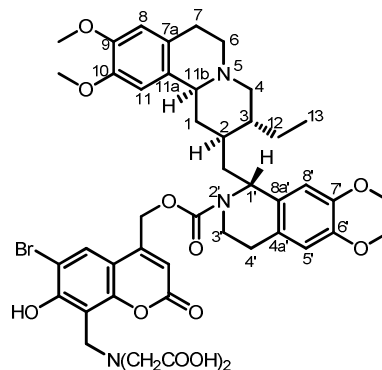
HRMS ber. 1034,4014, gef. 1034,4022 ([M+H]⁺)

Schmp. 142 °C

R_f (DC) 0,67 (CHCl₃/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 15,94 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxy-carbonyl}emetin (BBHCMOC-caged Emetin)**



107

50,00 mg (0,05 mmol) **106** wurden nach Methode E hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 17,38 min). Nach der Lyophilisierung wurden 36,3 mg (0,04 mmol, 82 %) **107** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 0,85 (t, ³J = 6,5, 3H, CH₂CH₃), 1,03 (t, ³J = 5,9, 1H, H-1_{ax}), 1,23-1,29 (m, 1H, H-12), 1,42-1,63 (m, 4H, H-2, H-3, H-10', H-12), 2,08-2,17 (m, 1H, H-10'), 2,71-2,94 (m, 4H), 3,13-3,35 (m, 5H), 3,46 (s, 4H, Cum-CH₂NCH₂CO), 3,53 (s, 3H, OCH₃), 3,59-3,63 (m, 3H, NCH₂CO), 3,72, 3,73 (s, 9H, OCH₃), 3,93-4,02 (m, 3H, Cum-CH₂N, H-1'), 4,20-4,23 (m, 1H), 5,18-5,47 (m, 3H, Cum-CH₂O, H-10'), 6,17 (s, 1H, CumH-3), 6,65, 6,73, 6,78, 6,88 (s, 4H, H-5', H-8, H-8', H-11), 7,92 (s, 1H, CumH-5), 9,88 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 9,8 (H-13), 21,7, 25,3, 27,4, 32,5, 35,5, 36,9, 37,2, 47,8 (Cum- CH_2N), 50,87, 50,92 (C-6, C-1'), 53,5 (N CH_2CO), 55,1 (O CH_3), 55,47 (O CH_3), 55,51 (O CH_3), 55,7 (O CH_3), 57,6, 62,6 (Cum- CH_2O), 62,7, 106,3 (CumC-6), 107,8, 110,6, 111,6, 112,2 (C-5', C-8', C-8, C-11), 108,0 (CumC-3), 110,09 (CumC-8), 110,14 (CumC-4a), 123,3, 123,4, 124,9, 129,4 (C-4'a, C-8'a, C-7a, C-11a), 127,2 (CumC-5), 147,2, 147,6, 147,7, 148,3 (C-6', C-7', C-9, C-10), 151,7 (CumC-4), 151,8 (CumC-7/CumC-8a), 154,4 (Cum- CH_2OCO), 157,6 (CumC-7/CumC-8a), 159,2 (CumC-2), 172,1 (COOH).

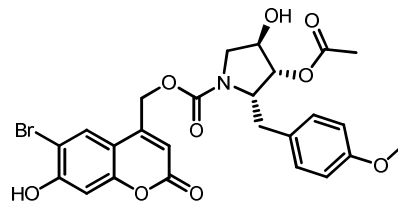
Elementaranalyse $\text{C}_{45}\text{H}_{52}\text{BrN}_3\text{O}_{13}$: ber. C 58,57 %, H 5,68 %, N 4,55 %,
gef. C 58,78 %, H 5,69 %, N 4,53 %

HRMS ber. 922,2756, gef. 922,2723 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Schmp. 168-173 °C

t_{R} (HPLC) 9,48 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methoxycarbonyl]anisomycin⁸⁸ (BHCMOCCaged Anisomycin)**



108

51,5 mg (0,19 mmol) **16** wurden nach Methode B in THF innerhalb von 5,5 h in den Aktivester *O*-[(6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl]-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**60**) überführt und dann nach Methode D mit 1 Äq. Anisomycin innerhalb von 4,5 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_{R} = 23,35 min) wurden 35,8 mg (0,06 mmol, 34 %) **108** als farbloser Feststoff in Form eines Konformerengemisches im Verhältnis 1,2:1 erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, d_6 -DMSO): δ 2,08 (s, 3H, OCO CH_3), 2,67-2,77 (m, 1H, CH_2Ph), 2,93-3,20 (m, 1H, CH_2Ph), 3,33-3,54 (m, 2H, CH_2N), 3,71 (s, 3H, O CH_3), 3,89 (s, 1H, CHOH), 4,20-4,29 (m, 1H, CHOCOCH_3), 5,38 (s, 2H, Cum- CH_2), 6,18 (s, 1H, CumH-3), 6,76-6,84 (m, 2H, Ph-3, Ph-5), 6,93 (s, 1H, CumH-8), 6,89-7,09 (m, 2H, Ph-2, Ph-6), 7,94 (s, 1H, CumH-5), 11,56 (bs, 1H, OH).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, d_6 -DMSO, 293 K): δ 2,06, 2,08 (s, 3H, OCO CH_3), 2,68-2,75 (m, 2H, CH_2Ph), 2,99 (d, $^3J = 5,9$, 1H, CH_2Ph), 3,01 (d, $^3J = 3,8$, 1H, CH_2Ph), 3,17 (d, $^3J = 3,8$, 1H, CH_2Ph), 3,20 (d, $^3J = 3,3$, 1H, CH_2Ph), 3,34-3,52 (m, 2H, CH_2N), 3,67, 3,71 (s, 3H, O CH_3), 3,87-3,88 (m, 1H, CHOH), 3,91-3,92 (m, 1H, CHOH), 4,19-4,22 (m, 1H, CHN), 4,27-4,30 (m, 1H, CHN), 4,68 (t, $^3J = 4,4$, 1H, CHOCOCH_3), 4,70 (t, $^3J = 4,6$, 1H, CHOCOCH_3), 5,28-5,35 (m, 2H, Cum- CH_2), 5,39 (s, 2H, Cum- CH_2), 6,18, 6,19 (s, 1H, CumH-3), 6,77 (d, $^3J = 8,2$, 2H, Ph-3, Ph-5), 6,83 (d, $^3J = 8,3$, 2H, Ph-3, Ph-5), 6,92, 6,93 (s, 1H, CumH-8), 6,99 (d, $^3J = 8,8$, 2H, Ph-2, Ph-6), 7,06 (d, $^3J = 8,3$, 2H, Ph-2, Ph-6), 7,94, 7,95 (s, 1H, CumH-5), 11,55, 11,57 (bs, 1H, OH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 20,7 (OCOCH₃), 31,9, 33,2 (CH₂Ph), 52,1, 52,2 (CH₂N), 54,9 (OCH₃), 59,1, 59,8 (CHN), 61,7, 62,3 (Cum-CH₂O), 69,9, 70,2 (CHOH), 76,5, 77,3 (CHOCOCH₃), 103,2 (CumC-8), 106,3 (CumC-6), 108,4, 109,5 (CumC-3), 110,4, 110,6 (CumC-4a), 113,7, 113,8 (Ph-3, PhC-5), 128,5, 128,7 (CumC-5), 129,5, 129,7 (PhC-1), 130,0 (2C, PhC-2, PhC-6), 150,2, 150,9 (CumC-4), 153,8, 153,9 (OCON), 154,1 (CumC-7/CumC-8a), 157,4 (CumC-7/CumC-8a), 157,7 (PhC-4), 159,7 (CumC-2), 169,6 (OCOCH₃).

Elementaranalyse C₂₅H₂₄BrNO₉: ber. C 53,39 %, H 4,30 %, N 2,49 %;
gef. C 53,64 %, H 4,21 %, N 2,54 %

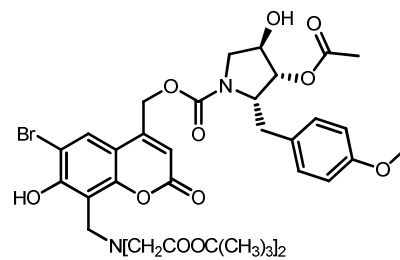
HRMS ber. 562,0707; gef. 562,0719 ([M+H]⁺)

Schmp. 92 °C

R_f (DC) 0,51 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 11,50 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methoxycarbonyl}anisomycin**



109

105,68 mg (0,2 mmol) **17** wurden nach Methode B in DMF innerhalb von 12 h in den Aktivester *O*-{[8-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]methyl}-*O*-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (**61**) überführt und dann nach Methode D mit 0,75 Äq. Anisomycin und 2 Äq. Et₃N innerhalb von 1 h umgesetzt. Nach Reinigung mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 36,80 min) wurden 104,9 mg (0,13 mmol, 64 %) **109** als farbloser Feststoff in Form eines Konformerengemisches im Verhältnis 1,8:1 erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 2,07 (s, 3H, OCOCH₃), 2,08 (s, 3H, OCOCH₃), 2,70-2,80 (m, 2H, CH₂Ph), 2,93-3,02 (m, 1H, CH₂Ph), 3,17-3,23 (m, 1H, CH₂Ph), 3,36-3,56 (m, 2H, NCH₂COH), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,89 (bs, 1H, CHOH), 4,16 (s, 2H, CH₂NCH₂CO), 4,21-4,27 (m, 1H, CHN), 4,69 (bs, 1H, CHOCOCH₃), 5,22-5,54 (m, 2H, Cum-CH₂O), 5,39 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,18 (s, 1H, CumH-3), 6,31 (s, 1H, CumH-3), 6,77 (d, ³J = 7,8, 2H, PhH-3, PhH-5), 6,83 (d, ³J = 8,1, 2H, PhH-3, PhH-5), 6,98 (d, ³J = 7,8, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,06 (d, ³J = 8,1, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,90 (s, 1H, CumH-5), 7,92 (s, 1H, CumH-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 20,7 (OCOCH₃), 27,7 (C(CH₃)₃), 31,9 (CH₂Ph), 47,9 (Cum-CH₂N), 52,0 (CHOHCH₂N), 54,7 (NCH₂OCOC(CH₃)₃), 54,9 (OCH₃), 59,7 (CH₂OH), 61,6 (Cum-CH₂), 61,8 (Cum-CH₂), 70,2 (CHOH), 76,5 (CHOCOCH₃), 81,5 (C(CH₃)₃), 106,3 (CumC-6), 108,9 (CumC-3), 110,1 (C-8), 110,2 (C-4a), 113,6 (2C, PhC-3, PhC-5), 113,7 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,2 (CumC-5), 127,3 (CumC-5), 129,5 (PhC-1), 129,9 (2C, PhC-2, PhC-6), 149,7 (CumC-4), 151,7 (CumC-7/CumC-8a), 153,8 (OCON), 157,5 (CumC-7/CumC-8a), 157,7 (PhC-4), 159,1 (CumC-2), 159,2 (CumC-2), 169,6 (COOCH₃), 172,7 (OCOC(CH₃)₃).

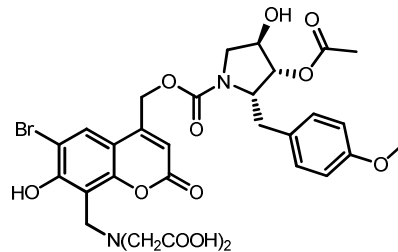
HRMS ber. 819,2334, gef. 819,2335 ([M+H]⁺)

Schmp. 58 °C

R_f (DC) 0,60 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 18,62 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

***N*-{8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-brom-7-hydroxycumarin-4-yl]-methoxycarbonyl}anisomycin (BBHCMOC-caged Anisomycin)**



110

16,00 mg (0,02 mmol) **109** wurden nach Methode E hydrolysiert. Die Reinigung erfolgte mittels präp. HPLC (5–50 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 35,00 min). Nach der Lyophilisierung wurden 9,2 mg (0,01 mmol, 67 %) **110** als farbloser Feststoff in Form eines als Konformerengemisches 1,5:1 erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (750 MHz, d_6 -DMSO): δ 2,06 (s, 3H, COOCH₃), 2,08 (s, 3H, COOCH₃), 2,69–2,76 (m, 2H, CH₂Ph), 3,00 (dd, 3J = 4,1, 2J = 12,6, 1H, CH₂Ph), 3,19 (dd, 3J = 3,4, 2J = 13,5, 1H, CH₂Ph), 3,41–3,44 (m, 2H, NCH₂COH), 3,51 (s, 2H, NCH₂CO), 3,52 (s, 2H, NCH₂CO), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,88 (d, 3J = 3,6, 1H, CHOH), 3,92 (d, 3J = 4,2, 1H, CHOH), 4,20 (s, 2H, Cum-CH₂N), 4,22–4,21 (m, 1H, CHN), 4,30–4,27 (m, 1H, CHN), 4,68 (t, 3J = 4,7, 1H, CHOCOCH₃), 4,71 (t, 3J = 5,1, 1H, CHOCOCH₃), 5,28–5,35 (m, 2H, Cum-CH₂O), 5,39 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,18 (s, 1H, CumH-3), 6,77 (d, 3J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 6,83 (d, 3J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 6,99 (d, 3J = 8,2, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,06 (d, 3J = 8,5, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,92 (s, 1H, CumH-5), 7,93 (s, 1H, CumH-5), 12,73 (bs, 2H, COOH).

¹H-NMR (750 MHz, d₆-DMSO): δ 2,06 u. 2,08 (s, 3H, OCOCH₃), 2,69-2,76 (m, 2H, CH₂Ph), 3,00, 3,19 (dd, ³J = 4,1 u. 3,4, ²J = 12,6 u. 13,5, 1H, CH₂Ph), 3,41-3,44 (m, 2H, NCH₂COH), 3,51, 3,52 (s, 2H, NCH₂CO), 3,67, 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,88, 3,92 (d, ³J = 3,6 u. 4,2, 1H, CHOH), 4,20 (s, 2H, Cum-CH₂N), 4,21-4,22, 4,27-4,30 (m, 1H, CHN), 4,68, 4,71 (t, ³J = 4,7 u. 5,1, 1H, CHOCOCH₃), 5,28-5,35 (m, 2H, Cum-CH₂O), 5,39 (s, 2H, Cum-CH₂O), 6,18 (s, 1H, CumH-3), 6,77 u. 6,83 (d, ³J = 8,4, 2H, PhH-3, PhH-5), 6,99, 7,06 (d, ³J = 8,2 u. 8,5, 2H, PhH-2, PhH-6), 7,92, 7,93 (s, 1H, CumH-5), 12,73 (bs, 2H, COOH).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 20,7 (COOCH₃), 31,9 (CH₂Ph), 47,9 (Cum-CH₂N), 52,0 (CHOHCH₂N), 53,5 (NCH₂COOH), 54,9 (OCH₃), 59,7 (CH₂OH), 70,2 (CHOH), 76,5 (CHCOOCH₃), 106,2 (CumC-6), 108,3 (CumC-3), 110,2 (C-8), 110,3 (C-4a), 113,7 (2C, PhC-3, PhC-5), 127,2 (CumC-5), 129,7 (PhC-1), 129,9 (2C, PhC-2, PhC-6), 151,8 (CumC-4), 153,8 (COON), 154,1 (CumC-7/CumC-8a), 157,5 (CumC-7/CumC-8a), 157,7 (PhC-4), 159,3 (CumC-2), 169,6 (OCOCH₃), 172,1 (COOH).

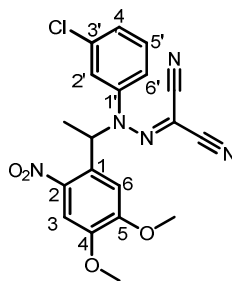
Elementaranalyse C₃₀H₃₁BrN₂O₁₃: ber. C 50,93 %, H 4,42 %, N 3,96 %,
gef. C 50,95 %, H 4,54 %, N 3,92 %

HRMS ber. 707,1081, gef. 707,1097 ([M+H]⁺)

Schmp. 127-132 °C

t_R (HPLC) 9,53 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

Carbonylcyanid-*N*-(3-chlorphenyl)-*N*-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenylethyl)-hydrazon (DMNPE-*caged* CCCP)



111

900 mg (4,00 mmol) 1-Acetyl-4,5-dimethoxy-2-nitrobenzol (**33**), 128 µl AcOH und 120,14 mg (4,8 mmol) Hydrazin-monohydrat wurden in 16 ml absolutem EtOH 5 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert, der Rückstand in CHCl₃ gelöst und mit dest. H₂O ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 20 ml CHCl₃ gelöst, mit 2 g MnO₂ 20 min intensiv gerührt und danach filtriert. Zu der erhaltenen Reaktionslösung, welche die Diazoverbindung **31** enthielt, wurde eine Lösung von 130,96 mg (0,64 mmol) CCCP in 5 ml Dioxan hinzugegeben und das CHCl₃ wurde im Vakuum entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei RT gerührt und das erhaltene Produkt mittels Flash-SC (CH₂Cl₂/MeOH = 200/0 bis 200/1) gereinigt. Anschließend wurde das vorgereinigte Produkt mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 33,21 min) nochmals gereinigt. Nach Lyophilisierung wurden 221,6 mg (0,54 mmol, 84 %) **111** als gelber Feststoff erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO, 267 °K): δ 1,88 (dd, ⁴J = 2,1, ³J = 6,4, 3H, CH₃), 3,98 (d, ⁴J = 2,5, 3H, OCH₃), 4,03 (s, 3H, OCH₃), 5,88 (q, ³J = 6,5, 1 H, CHCH₃), 6,63-6,77 (m, 1H, PhH-4', PhH-5', PhH-6'), 7,02-7,17 (m, 1H, PhH-4', PhH-5', PhH-6'), 7,27-7,33 (m, 2H, PhH-6, PhH-4', PhH-5', PhH-6'), 7,44-7,52 (m, 2H, PhH-3, PhH-2').

Elementaranalyse C₁₉H₁₆ClN₅O₄: ber. C 55,15 %, H 3,90 %, N 16,92 %, gef. C 55,20 %, H 3,73 %, N 16,92 %

HRMS ber. 436,0783, gef. 436,0778 ([M+Na]⁺)

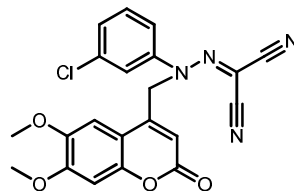
Maldi-MS ber. 414,0964, gef. 414,07 ([M+H]⁺), ber. 436,0783, gef. 436,04 ([M+Na]⁺), ber. 452,0522, gef. 452,02 ([M+K]⁺)

Schmp. 52 °C

R_f (DC) 0,94 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 15,78 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

Carbonylcyanid-*N*-(3-chlorphenyl)-*N*-[(6,7-dimethoxycumarin-4-yl)methyl]-hydrazon (DMCM-*caged* CCCP)



112

53,60 mg (0,22 mmol) **27** in 10 ml MeCN wurden mit einer Lösung von 44,36 mg (0,22 mmol) CCCP in 2 ml Dioxan versetzt. Nach 12 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels präp. HPLC (45–50 % B in A, 0-40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, t_R = 34,56 min) gereinigt. Nach Lyophilisierung resultierten 19,7 mg (0,05 mmol, 22 %) **112** als gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 3,58 (s, 2H, CH₂), 3,83 (s, 6H, OCH₃), 6,38 (s, 1H, CumH-3), 6,49 (s, 1H, CumH-8), 7,09 (s, 1H, CumH-5), 7,31-7,44 (m, 1H, PhH-4, PhH-5, PhH-6), 7,66 (s, 1H, PhH-2).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 55,8 (CH₂), 56,2 (2C, OCH₃), 100,5 (CumC-5), 106,6 (CumC-8), 109,4 (CumC-4a), 113,6 (C≡N), 115,5 (C≡N), 115,8 (CumC-3), 121,0 (C=N), 122,4 (PhC-4 oder PhC-5 oder PhC-6), 123,8 (PhC-2), 128,6 (PhC-4 oder PhC-5 oder PhC-6), 131,0 (PhC-4 oder PhC-5 oder PhC-6), 137,8 (PhC-1 oder PhC-3), 140,0 (PhC-1 oder PhC-3), 141,4 (CumC-8a), 145,7 (CumC-7 oder CumC-6), 149,4 (CumC-4), 152,7 (CumC-7 oder CumC-6), 159,9 (CumC-2)

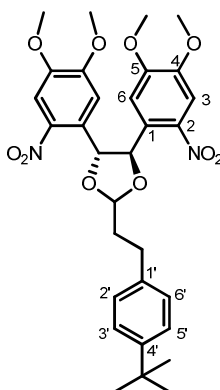
HRMS ber. 423,0855, gef. 423,0839 ([M+H]⁺)

Schmp. 108 °C

R_f (DC) 0,48 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1), 0,86 (CH₂Cl₂/MeOH = 19/1)

t_R (HPLC) 13,73 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

**4,5-Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan
(BDMNP-ED-*caged* Bourgeonal)**



113

165,5 mg (0,39 mmol) **35** wurden unter N_2 in 30 ml Toluol gelöst und mit 99,0 mg (0,39 mmol) PPTS sowie $MgSO_4$ im Überschuss versetzt. Nach 10 min Rühren wurden 0,23 ml (1,17 mmol) Bourgeonal zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 12 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min^{-1} , Nucleodur C 18 ec, $t_R = 38,11$ min) gereinigt. Es wurden 25,5 mg (0,04 mmol, 11 %) **113** als farbloser Feststoff erhalten.

1H -NMR (300 MHz, d_6 -DMSO): δ 1,26 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 2,12–2,19 (m, 2H, $CHCH_2CH_2$), 2,78–2,84 (m, 2H, $CHCH_2CH_2$), 3,87 (s, 3H, 5- OCH_3), 3,93 (s, 3H, 4- OCH_3), 5,55 (t, $^4J = 4,5$, 1H, $CHCH_2CH_2$), 5,68 (dd, $^4J = 6,9$, $^3J = 19,8$, 2H, Ph-CHO), 7,19 (d, $^3J = 8,1$, 2H, H-2'/6'), 7,26 (s, 1H, H-6), 7,31 (d, $^3J = 8,4$, 2H, H-3'/5'), 7,34 (s, 1H, H-6), 7,54 (s, 1H, H-3), 7,56 (s, 1H, H-3).

^{13}C -NMR (75,5 MHz, d_6 -DMSO): δ 28,9 ($CHCH_2CH_2$), 31,2 ($C(CH_3)_3$), 34,0 ($C(CH_3)_3$), 35,3 ($CHCH_2CH_2$), 56,1 (OCH_3), 56,2 (OCH_3), 79,4 (Ph-CHO), 79,7 (Ph-CHO), 104,4 ($CHCH_2CH_2$), 107,5 (C-3), 107,9 (C-3), 109,7 (C-6), 125,1 (2C, C-3'/5'), 127,9 (2C, C-2'/6'), 128,2 (C-2), 128,7 (C-2), 138,0 (C-1'), 140,6 (C-1), 148,0 (C-4), 148,2 (C-4'), 152,9 (C-5).

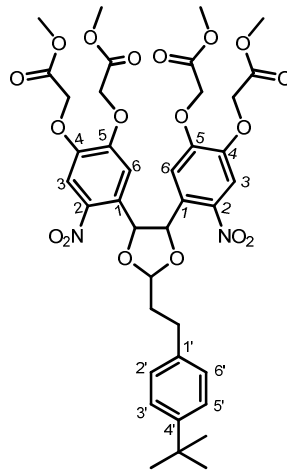
HRMS ber. 597,2443, gef. 597,2443 ($[M+H]^+$)

Schmp. 80 °C

R_f (DC) 0,86 (*n*-Hexan/AcOEt = 1/1)

t_R (HPLC) 20,41 min (20–95 % B in A, 0–30 min, Nucleodur C 18 ec)

4,5-Bis[4,5-bis(methoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan



114

63,7 mg (0,10 mmol) **40**, 400 mg MgSO₄ und 24,38 mg (0,10 mmol) PPTS wurden in 50 ml Toluol unter N₂ 10 min gerührt. Danach wurden 59,5 µl (0,29 mmol) Bourgeonal hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 10 h bei 120 °C gerührt. MgSO₄ wurde abgesaugt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und anschließend wurde der Rückstand mittels präp. HPLC (30-95 % B in A, 0-60 min, 9,2 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t_R* = 55,70 min) gereinigt. Es wurden 16,9 mg (0,02 mmol, 21 %) **114** als hellgelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,27 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,04-2,11 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,74 (t, ³J = 8,0, 2H, CHCH₂CH₂), 3,58 (s, 3H, OCH₃), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,72 (s, 6H, OCH₃), 5,00 (s, 4H, CH₂CO₂), 5,07 (s, 2H, CH₂CO₂), 5,10 (s, 2H, CH₂CO₂), 5,42 (t, ³J = 4,5, 1H, DioxH-1), 5,62 (d, ³J = 5,2, 1H, DioxH-3 oder DioxH-4), 5,69 (d, ³J = 5,3, 1H, DioxH-3 oder DioxH-4), 7,20 (d, ³J = 8,2, 2H, PhH-2'/6'), 7,23 (s, 1H, H-6), 7,24 (s, 1H, H-6), 7,32 (d, ³J = 7,3, 2H, PhH-3'/5'), 7,60 (s, 1H, H-3), 7,62 (s, 1H, H-3).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 29,0 (CH₂Ph), 31,2 (C(CH₃)₃), 34,0 (C(CH₃)₃), 35,4 (CH(CH₂)₂), 51,8 (OCH₃), 51,9 (2C, OCH₃), 52,0 (OCH₃), 65,5 (2C, CH₂O), 65,6 (2C, CH₂O), 78,7 (DioxC-3 oder DioxC-4), 79,6 (DioxC-3 oder DioxC-4), 104,4 (DioxC-1), 109,9 (C-3), 110,4 (C-3), 112,0 (C-6), 112,2 (C-6), 125,1 (2C, PhC-3'/5'), 127,9 (2C, PhC-2'/6'), 129,0 (C-2), 129,3 (C-2), 138,0 (PhC-1'), 140,9 (C-1), 141,1 (C-1), 146,4 (2C, C-4 oder C-5), 148,2 (PhC-4'), 151,0 (C-4 oder C-5), 151,2 (C-4 oder C-5), 168,48 (COOCH₃), 168,50 (COOCH₃), 168,59 (COOCH₃), 168,62 (COOCH₃).

HRMS ber. 851,2481, gef. 851,2465 ([M+Na]⁺)

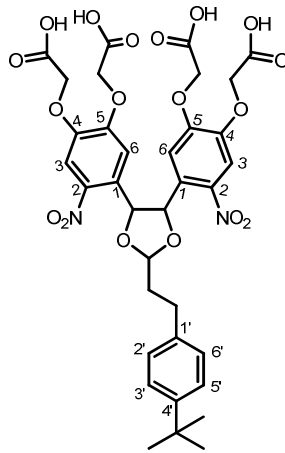
Schmp. 39-41 °C

R_f (DC) 0,57 (*n*-Hexan/AcOEt = 2/1)

t_R (HPLC) 17,69 min (30–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

18,58 min (20–95 % B in A, 0-20 min, Nucleodur C 18 ec)

4,5-Bis[4,5-bis(carboxymethoxy)-2-nitrophenyl]-2-(4-*tert*-butylphenethyl)-1,3-dioxolan (BBCMNP-ED-*caged* Bourgeonal)



115

13 mg (0,016 mmol) **114** und 6,58 mg (0,16 mmol) LiOH·H₂O wurden in 4,5 ml THF/H₂O (2/1) 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Produkt mittels präp. HPLC (20–95 % B in A, 0–40 min, 13,8 ml min⁻¹, Nucleodur C 18 ec, *t_R* = 25,28 min) gereinigt. Es wurden 9,9 mg (0,013 mmol, 82 %) **115** als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ 1,26 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,07–2,12 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,77 (t, ³J = 8,0, 2H, CHCH₂CH₂), 4,86 (s, 4H, OCH₂), 4,93 (d, ³J = 7,2, 4H, OCH₂), 5,43 (t, ³J = 4,4, 1H, DioxH-1), 5,62 (d, ³J = 5,2, 1H, DioxH-3 oder DioxH-4), 5,69 (d, ³J = 5,2, 1H, DioxH-3 oder DioxH-4), 7,19–7,25 (m, 4H, H-6, PhH-2'/6'), 7,32 (d, ³J = 8,1, 2H, PhH-3'/5'), 7,54 (s, 1H, H-3), 7,57 (s, 1H, H-3).

¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO): δ 29,0 (CH₂Ph), 31,2 (C(CH₃)₃), 34,1 (C(CH₃)₃), 35,3 (CHCH₂CH₂), 65,4 (OCH₂), 79,0 (DioxC-3 oder DioxC-4), 79,9 (DioxC-3 oder DioxC-4), 104,5 (DioxC-1), 109,6 (C-3), 110,1 (C-3), 111,65 (C-6), 111,68 (C-6), 125,1 (2C, PhC-3'/5'), 128,0 (2C, PhC-2'/6'), 129,0 (C-2), 129,2 (C-2), 138,1 (PhC-1'), 140,5 (C-1), 140,6 (C-1), 146,48 (C-4), 146,54 (C-4), 148,1 (PhC-4'), 151,4 (C-5), 151,5 (C-5), 169,4 (COOH), 169,5 (COOH), 169,6 (COOH).

HRMS ber. 773,1890, gef. 773,1831 ([M+H]⁺)

Schmp. 105 °C

***t_R* (HPLC)** 13,19 min (20–95 % B in A, 0–30 min, Nucleodur C 18 ec)
12,77 min (20–95 % B in A, 0–20 min, Nucleodur C 18 ec)

6 Literaturverzeichnis

- [1] (a) V. N. R. Pillai, "Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis", *Synthesis (Stuttg)* **1980**, 1-26; (b) T. Greene, P. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis"; John Wiley & Sons, **1999**.
- [2] M. Schelhaas, H. Waldmann, "Schutzgruppenstrategien in der Organischen Synthese", *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2192-2219.
- [3] (a) P. Kocienski, "Protecting Groups", *Georg Thieme Verlag* **2003**; (b) J. A. Barltrop, P. Schofield, "Photosensitive Protecting Groups", *Tetrahedron Lett.* **1962**, 697-699.
- [4] (a) A. P. Pelliccioli, J. Wirz, "Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications", *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441-458; (b) M. Goeldner, R. Givens, "Dynamic studies in biology: Phototriggers, photoswitches and caged biomolecules"; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**; (c) G. Mayer, A. Heckel, "Biologisch aktive Moleküle mit "Lichtschalter"", *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020-5042; (d) J. M. Alonso, A. Reichel, J. Piehler, A. del Campo, "Photopatterned surfaces for site-specific and functional immobilization of proteins", *Langmuir* **2008**, *24*, 448-457.
- [5] (a) C. G. Bochet, "Wavelength-selective cleavage of photolabile protecting groups", *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6341-6346; (b) C. G. Bochet, "Orthogonale Photolyse von Schutzgruppen", *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2140-2142; (c) N. Kotzur, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, **2009**; (d) N. Kotzur, B. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, "Wavelength-Selective Photoactivatable Protecting Groups for Thiols", *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16927-16931.
- [6] N. Hoffmann, "Photochemical reactions as key steps in organic synthesis", *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1052-1103.
- [7] K. C. Nicolaou, N. Watanabe, J. Li, J. Pastor, N. Winssinger, "Einfache Festphasensynthese von Oligosacchariden – Herstellung eines Dodecasaccharids", *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1636-1638.
- [8] (a) G. M. Wallraff, W. D. Hinsberg, "Lithographic imaging techniques for the formation of nanoscopic features", *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1801-1821; (b) A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, "Oberflächenmodifikation mit orthogonalen photosensitiven Silanen zur sequenziellen chemischen Lithographie und ortsselektiven Partikelabscheidung", *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4785-4791.
- [9] (a) S. Kantevari, G. R. J. Gordon, B. A. MacVicar, G. C. R. Ellis-Davies, "A practical guide to the synthesis and use of membrane-permeant acetoxymethyl esters of caged inositol polyphosphates", *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 327-337; (b) G. C. R. Ellis-Davies, "Two-Photon Microscopy for Chemical Neuroscience", *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 185-197; (c) D. Warther, S. Gug, A. Specht, F. Bolze, J. F. Nicoud, A. Mourot, M. Goeldner, "Two-photon uncaging: New prospects in neuroscience and cellular biology", *Biorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7753-7758.
- [10] (a) R. Givens, "Photoremovable protecting groups" in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; W. M. Horspool, F. Lenci; CRC Press: Boca Raton, Florida, **2004**, 2. Ed. Ausg., 69.1-69.46; (b) G. Marriott, "Methods in Enzymology - Caged compounds"; Academic Press: San Diego, Kalifornien, **1998**.
- [11] (a) J. C. Sheehan, R. M. Wilson, A. W. Oxford, "The Photolysis of Methoxy-Substituted Benzoin Esters. A Photosensitive Protecting Group for Carboxylic Acids", *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 7222-7228; (b) J. C. Sheehan, R. M. Wilson, "Photolysis of Desyl Compounds. A New Photolytic Cyclization", *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5277-5281.
- [12] (a) J. C. Sheehan, K. Umezawa, "Phenacyl Photosensitive Blocking Groups", *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 3771-3774; (b) R. S. Givens, C. H. Park, "p-Hydroxyphenacyl ATP: A new

- phototrigger*", *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6259-6262; (c) R. S. Givens, K. Stensrud, P. G. Conrad, A. L. Yousef, C. Perera, S. N. Senadheera, D. Heger, J. Wirz, "*p*-Hydroxyphenacyl photoremovable protecting groups - Robust photochemistry despite substituent diversity", *Can. J. Chem.* **2011**, *89*, 364-384.
- [13] (a) O. D. Fedoryak, T. M. Dore, "*Brominated hydroxyquinoline as a photolabile protecting group with sensitivity to multiphoton excitation*", *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3419-3422; (b) Y. Zhu, C. M. Pavlos, J. P. Toscano, T. M. Dore, "*8-Bromo-7-hydroxyquinoline as a photoremovable protecting group for physiological use: Mechanism and scope*", *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4267-4276; (c) M. J. Davis, C. H. Kragor, K. G. Reddie, H. C. Wilson, Y. Zhu, T. M. Dore, "*Substituent Effects on the Sensitivity of a Quinoline Photoremovable Protecting Group to One- and Two-Photon Excitation*", *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1721-1729.
- [14] J. A. Barltrop, P. J. Plant, Schofiel.P, "*Photosensitive Protective Groups*", *Chem. Commun.* **1966**, 822-823.
- [15] Y. Degani, H. Neumann, A. Patchorn, "*Selective cyanylation of sulfhydryl groups*", *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6969-6971.
- [16] (a) A. Specht, M. Goeldner, "*1-(o-Nitrophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl Ether Derivatives as Stable and Efficient Photoremovable Alcohol-Protecting Groups*", *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2042-2046; (b) D. Leipert, P. Heiduschka, J. Mack, H.-J. Egelhaaf, D. Oelkrug, G. Jung, "*Ortsaufgelöste Immobilisierung von Peptiden durch elektrochemische Polymerisation nach photolytischer Abspaltung einer Schutzgruppe*", *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2471-2474.
- [17] C. Y. Chang, B. Niblack, B. Walker, H. Bayley, "*A photogenerated pore-forming protein*", *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 391-400.
- [18] (a) A. Blanc, C. G. Bochet, "*Bis(o-nitrophenyl)ethanediol: A Practical Photolabile Protecting Group for Ketones and Aldehydes*", *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1138-1141; (b) S. Kantevari, C. V. Narasimaji, H. B. Mereyala, "*Bis(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethylene glycol: a new and efficient photolabile protecting group for aldehydes and ketones*", *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5849-5854.
- [19] C. G. Bochet, "*Photolabile protecting groups and linkers*", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 125-142.
- [20] (a) D. F. Wöll, Dissertation, Universität Konstanz, **2006**; (b) S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, "*Photolabile protecting groups for nucleosides: Mechanistic studies of the 2-(2-nitrophenyl)ethyl group*", *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601-1611.
- [21] (a) Y. V. Il'ichev, "*Rearrangements of 2-nitrobenzyl compounds. 2. Substituent effects on the reactions of the quinonoid intermediates*", *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10159-10170; (b) Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer, J. Wirz, "*Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds: Methyl ethers and caged ATP*", *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581-4595; (c) M. Gaplovsky, Y. V. Il'ichev, Y. Kamdzhilov, S. V. Kombarova, M. Mac, M. A. Schwörer, J. Wirz, "*Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds: 2-Nitrobenzyl alcohols form 2-nitroso hydrates by dual proton transfer*", *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 33-42; (d) T. Schmierer, W. J. Schreier, F. O. Koller, T. E. Schrader, P. Gilch, "*Impact of vibrational excitation on the kinetics of a nascent ketene*", *Phys Chem Chem Phys* **2009**, *11*, 11596-607; (e) G. Papageorgiou, D. Ogden, J. E. T. Corrie, "*An antenna-sensitized nitroindoline precursor to enable photorelease of L-glutamate in high concentrations*", *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7228-7233.
- [22] (a) S. R. Adams, J. P. Y. Kao, R. Y. Tsien, "*Biologically useful Chelators that take up Ca²⁺ upon Illumination*", *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7957-7968; (b) N. Bindman, R. Merx, R. Koehler, N. Herrman, W. A. van der Donk, "*Photochemical cleavage of leader peptides*", *Chem Commun* **2010**, *46*, 8935-8937; (c) A. Taniguchi, M. Skwarczynski, Y. Sohma, T. Okada, K. Ikeda, H. Prakash, H. Mukai, Y. Hayashi, T. Kimura, S. Hirota, K. Matsuzaki, Y. Kiso, "*Controlled Production of Amyloid beta Peptide from a Photo-Triggered, Water-Soluble Precursor Click Peptide*", *ChemBioChem* **2008**, *9*, 3055-3065; (d) H. M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence,

- "*Illuminating the Chemistry of Life: Design, Synthesis, and Applications of "Caged" and Related Photoresponsive Compounds*", *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409-427; (e) A. Deiters, "*Light activation as a method of regulating and studying gene expression*", *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 678-686; (f) J. M. Nerbonne, S. Richard, J. Nargeot, H. A. Lester, "*New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations*", *Nature* **1984**, *310*, 74-76.
- [23] (a) R. Wieboldt, K. R. Gee, L. Niu, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, "*Photolabile precursors of glutamate: Synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8752-8756; (b) D. Gilbert, K. Funk, B. Dekowski, R. Lechler, S. Keller, F. Mohrlen, S. Frings, V. Hagen, "*Caged capsaicins: New tools for the examination of TRPV1 channels in somatosensory neurons*", *ChemBioChem* **2007**, *8*, 89-97; (c) N. Kotzur, B. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, "*Competition between cleavage and decarboxylation in photolysis of alpha-carboxy-2-nitrobenzyl protected cysteine derivatives*", *Chem. Commun.* **2009**, 3255-3257; (d) K. R. Gee, R. Wieboldt, G. P. Hess, "*Synthesis and Photochemistry of a New Photolabile Derivative of GABA. Neurotransmitter Release and Receptor Activation in the Microsecond Time Region*", *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8366-8367.
- [24] (a) J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, "*Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analogue: Utilization by the Na:K Pump of Human Red Blood Cell Ghosts*", *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929-1935; (b) J. F. Wootton, D. R. Trentham, "*Caged Compounds to probe the dynamics of cellular processes: synthesis and properties of some novel photosensitive p-2-nitrobenzyl esters of nucleotides*" in *Photochemical Probes in Biochemistry*; Hrsg.: P. E. Nielsen, **1989**, 277-296; (c) M. Wilcox, R. W. Viola, K. W. Johnson, A. P. Billington, B. K. Carpenter, J. A. McCray, A. P. Guzikowski, G. P. Hess, "*Synthesis of Photolabile "Precursors" of Amino Acid Neurotransmitters*", *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1585-1589.
- [25] (a) A. Hasan, K. P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote, "*Photolabile protecting groups for nucleosides: Synthesis and photodeprotection rates*", *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247-4264; (b) S. Buhler, I. Lagoja, H. Giegrich, K. P. Stengele, W. Pfeleiderer, "*New types of very efficient photolabile protecting groups based upon the 2-(2-nitrophenyl)propoxy carbonyl (NPPOC) moiety*", *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 620-659.
- [26] (a) J. Hebert, D. Gravel, "*o-Nitrophenylethylene Glycol: a Photosensitive Protecting Group for Aldehydes and Ketones*", *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 187-189; (b) D. Gravel, J. Hebert, D. Thoraval, "*o-Nitrophenylethylene glycol as photoremovable protective group for aldehydes and ketones: syntheses, scope, and limitations*", *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 400-410.
- [27] (a) P. F. Wang, H. Y. Hu, Y. Wang, "*Application of the excited state meta effect in photolabile protecting group design*", *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2831-2833; (b) P. F. Wang, Y. Wang, H. Y. Hu, C. Spencer, X. Liang, L. R. Pan, "*Sequential removal of photolabile protecting groups for carbonyls with controlled wavelength*", *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6152-6157; (c) P. F. Wang, M. Mondal, Y. Wang, "*Photolabile Carbonyl Protecting Group: A New Tool for Light-Controlled Release of Anticancer Agents*", *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2055-2058; (d) H. S. Yang, X. Zhang, L. Zhou, P. F. Wang, "*Development of a Photolabile Carbonyl-Protecting Group Toolbox*", *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2040-2048.
- [28] S. Pass, B. Amit, A. Patchornik, "*Racemization-Free Photochemical Coupling of Peptide Segments*", *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7674-7675.
- [29] (a) J. Morrison, P. Wan, J. E. T. Corrie, G. Papageorgiou, "*Mechanisms of photorelease of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in solutions of varying water content*", *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 960-969; (b) F. Afroz, A. D. Barone, P. A. Bury, C. A. Chen, A. Cuppoletti, R. G. Kuimelis, H. D. Li, G. H. McCall, "*Photo-removable protecting groups for in situ DNA microarray synthesis*", *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 1936-1939; (c) G. Papageorgiou, D. C. Ogden, A. Barth, J. E. T. Corrie, "*Photorelease of Carboxylic Acids from 1-Acyl-7-nitroindolines in Aqueous Solution: Rapid and Efficient Photorelease of L-Glutamate*", *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6503-6504.

- [30] R. S. Givens, B. Matuszewski, "Photochemistry of Phosphate Esters: An Efficient Method for the Generation of Electrophiles", *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860-6861.
- [31] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, "Deactivation Behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives. 2. Photocleavage of selected (coumarin-4-yl)methyl-caged adenosine cyclic 3',5'-monophosphates with fluorescence enhancement", *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703-710.
- [32] V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, "Langweilig UV/Vis-anregbare, hocheffiziente und ultraschnelle Phototrigger für cAMP und cGMP", *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1077-1080.
- [33] V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geissler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf, B. Wiesner, "Ultraschnelle Freisetzung hoher Konzentrationen von cyclischen Nucleotiden aus Cumarinylmethylestern durch Ein- und Zweiphotonenphotolyse", *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 8099-8104.
- [34] T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, "Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1193-1200.
- [35] (a) F. Kilic, N. D. Kashikar, R. Schmidt, L. Alvarez, L. Dai, I. Weyand, B. Wiesner, N. Goodwin, V. Hagen, U. B. Kaupp, "Caged Progesterone: A New Tool for Studying Rapid Nongenomic Actions of Progesterone", *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9463-9463; (b) V. Hagen, B. Dekowski, N. Kotzur, R. Lechler, B. Wiesner, B. Briand, M. Beyermann, "{7-Bis(carboxymethyl)amino coumarin-4-yl}methoxycarbonyl derivatives for photorelease of carboxylic acids, alcohols/phenols, thioalcohols/thiophenols, and amines", *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1621-1627; (c) D. Geißler, Y. N. Antonenko, R. Schmidt, S. Keller, O. O. Krylova, B. Wiesner, J. Bendig, P. Pohl, V. Hagen, "(Coumarin-4-yl)methylester als hocheffiziente und ultraschnelle Phototrigger für Protonen und ihre Anwendung zur Oberflächenansäuerung von Membranen", *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1219-1223.
- [36] (a) B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, "Deactivation behavior and excited-state properties of (coumarin-4-yl)methyl derivatives. 1. Photocleavage of (7-methoxycoumarin-4-yl)methyl-caged acids with fluorescence enhancement", *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109-9117; (b) V. Hagen, F. Kilic, J. Schaal, B. Dekowski, R. Schmidt, N. Kotzur, "8-Bis(carboxymethyl)aminomethyl-6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl methyl Moieties as Photoremovable Protecting Groups for Compounds with COOH, NH₂, OH, and C=O Functions", *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2790-2797; (c) R. O. Schonleber, J. Bendig, V. Hagen, B. Giese, "Rapid photolytic release of cytidine 5-diphosphate from a coumarin derivative: A new tool for the investigation of ribonucleotide reductases", *Biorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 97-101.
- [37] R. O. Schoenleber, B. Giese, "Photochemical release of Amines by C,N-bond cleavage", *Synlett* **2003**, 501-504.
- [38] A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Ishii, M. Iwamura, T. Furuta, "Coumarin-4-ylmethoxycarbonyls as phototriggers for alcohols and phenols", *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4867-4870.
- [39] J. H. Wosnick, M. S. Shoichet, "Three-dimensional chemical Patterning of transparent hydrogels", *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 55-60.
- [40] M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, "Bhc-diol as a photolabile protecting group for aldehydes and ketones", *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119-2122.
- [41] (a) R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, "Kinetics Study of the Photocleavage of (Coumarin-4-yl)methyl Esters", *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5000-5004; (b) R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, "Mechanism of photocleavage of (coumarin-4-yl)methyl esters", *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5768-5774.

- [42] V. Hagen, S. Frings, J. Bendig, D. Lorenz, B. Wiesner, U. B. Kaupp, "Fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung der Freisetzung von cyclischen Nucleotiden aus photoaktivierbaren [Bis(carboxymethoxy)cumarin-4-yl]methylestern in Zellen", *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3775-3777.
- [43] C. Zscherp, A. Barth, "Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein reaction mechanisms", *Biochemistry* **2001**, *40*, 1875-1883.
- [44] (a) F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, "Light-activated gene expression", *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8777-8778; (b) S. B. Cambridge, D. Geissler, F. Calegari, K. Anastassiadis, M. T. Hasan, A. F. Stewart, W. B. Huttner, V. Hagen, T. Bonhoeffer, "Doxycycline-dependent photoactivated gene expression in eukaryotic systems", *Nat. Methods* **2009**, *6*, 527-U86.
- [45] T. Strunker, I. Weyand, W. Bonigk, Q. Van, A. Loogen, J. E. Brown, N. Kashikar, V. Hagen, E. Krause, U. B. Kaupp, "A K^+ -selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm", *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 1149-1198.
- [46] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, "Targeting expression with light using caged DNA", *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895-20900.
- [47] (a) S. R. Adams, J. P. Y. Kao, G. Grynkiewicz, A. Minta, R. Y. Tsien, "Biologically Useful Chelators That Release Ca^{2+} upon Illumination", *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3212-3220; (b) G. C. R. Ellis-Davies, J. H. Kaplan, "A New Class of Photolabile Chelators for the Rapid Release of Divalent Cations: Generation of Caged Ca^{2+} and Caged Mg^{2+} ", *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1966-1969; (c) G. C. R. Ellis-Davies, J. H. Kaplan, "Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca^{2+} with high affinity and releases it rapidly upon photolysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 187-191; (d) G. C. R. Ellis-Davies, "Synthesis of photosensitive EGTA derivatives", *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 953-956.
- [48] (a) J. W. Walker, J. A. McCray, G. P. Hess, "Photolabile Protecting Groups for an Acetylcholine Receptor Ligand. Synthesis and Photochemistry of a New Class of *o*-Nitrobenzyl Derivatives and Their Effects on Receptor Function", *Biochemistry* **1986**, *25*, 1799-1805; (b) T. Milburn, N. Matsubara, A. P. Billington, J. B. Udgaonkar, J. W. Walker, B. K. Carpenter, W. W. Webb, J. Marque, W. Denk, J. A. McCray, G. P. Hess, "Synthesis, Photochemistry, and Biological Activity of a Caged Photolabile Acetylcholine Receptor Ligand", *Biochemistry* **1989**, *28*, 49-55; (c) M. Matsuzaki, G. C. R. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, "Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons", *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086-1092.
- [49] (a) J. W. Walker, A. V. Somlyo, Y. E. Goldman, A. P. Somlyo, D. R. Trentham, "Kinetics of smooth and skeletal-muscle activation by laser-pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate", *Nature* **1987**, *327*, 249-252; (b) J. W. Walker, J. Feeney, D. R. Trentham, "Photolabile Precursors of Inositol Phosphates. Preparation and Properties of 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Esters of myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphate", *Biochemistry* **1989**, *28*, 3272-3280; (c) M. Mentel, V. Laketa, D. Subramanian, H. Gillandt, C. Schultz, "Photoaktivierbares und zellmembranpermeables Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat", *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3895-3898.
- [50] (a) J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray, D. R. Trentham, "Photolabile 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Phosphate Esters of Adenine Nucleotide Analogues. Synthesis and Mechanism of Photolysis", *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7170-7177; (b) M. A. Priestman, L. A. Sun, D. S. Lawrence, "Dual Wavelength Photoactivation of cAMP- and cGMP-Dependent Protein Kinase Signaling Pathways", *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 377-384; (c) V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, B. Wiesner, B. Schade, S. Helm, D. Lorenz, U. B. Kaupp, "Synthesis, photochemistry and application of (7-methoxycoumarin-4-yl) methyl-caged 8-bromoadenosine cyclic 3',5'-monophosphate and 8-bromoguanosine cyclic 3',5'-monophosphate photolyzed in the nanosecond time region", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1999**, *53*, 91-102; (d) D. Geissler, W. Kresse, B. Wiesner, J. Bendig, H. Kettenmann, V. Hagen, "DMACM-caged adenosine nucleotides: Ultrafast phototriggers for ATP, ADP and AMP activated by long-wavelength irradiation", *ChemBioChem* **2003**, *4*, 162-170.

- [51] (a) J. W. Walker, S. H. Gilbert, R. M. Drummond, M. Yamada, R. Sreekumar, R. E. Carraway, M. Ikebe, F. S. Fay, "Signaling pathways underlying eosinophil cell motility revealed by using caged peptides", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1568-1573; (b) D. M. Rothman, E. J. Petersson, M. E. Vazquez, G. S. Brandt, D. A. Dougherty, B. Imperiali, "Caged phosphoproteins", *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 846-847.
- [52] (a) G. Marriott, "Caged Protein Conjugates and Light-Directed Generation of Protein Activity: Preparation, Photoactivation, and Spectroscopic Characterization of Caged G-Actin Conjugated", *Biochemistry* **1994**, *33*, 9092-9097; (b) D. Mendel, J. A. Ellman, P. G. Schultz, "Construction of a Light-Activated Protein by Unnatural Amino Acid Mutagenesis", *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2758-2760; (c) M. Ghosh, X. Y. Song, G. Mounemne, M. Sidani, D. S. Lawrence, J. S. Condeelis, "Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility", *Science* **2004**, *304*, 743-746; (d) A. Silanskas, M. Foss, W. Wende, C. Urbanke, A. Lagunavicius, A. Pingoud, V. Siksnys, "Photocaged Variants of the *MunI* and *PvuII* Restriction Enzymes", *Biochemistry* **2011**, *50*, 2800-2807.
- [53] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, "Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos", *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317-325.
- [54] (a) M. C. Pirrung, N. Chidambaram, "Preparation of Thymine Dinucleotide Methylphosphonate Analogs via Thymine Methylphosphonofluoridate", *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1540-1542; (b) A. Heckel, M. C. R. Buff, M.-S. L. Raddatz, J. Müller, B. Pötzsch, G. Mayer, "Ein Antikoagulans mit photoaktivierbarer Antidotaktivität", *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6900-6902; (c) A. Heckel, G. Mayer, "Light Regulation of Aptamer Activity: An Anti-Thrombin Aptamer with Caged Thymidine Nucleobases", *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 822-823.
- [55] (a) S. Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanemoto, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, "Two-color, two-photon uncaging of glutamate and GABA", *Nat. Methods* **2010**, *7*, 123-126; (b) G. C. R. Ellis-Davies, "A practical guide to the synthesis of dinitroindolyl-caged neurotransmitters", *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 314-326; (c) M. Canepari, L. Nelson, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, D. Ogden, "Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindolyl- and 4-methoxy-7-nitroindolyl-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters", *J. Neurosci. Methods* **2001**, *112*, 29-42.
- [56] V. R. Shembekar, Y. Chen, B. K. Carpenter, G. P. Hess, "A Protecting Group for Carboxylic Acids that can be photolyzed by Visible Light", *Biochemistry* **2005**, *44*, 7107-7114.
- [57] (a) W. A. Boyle, S. Muralidharan, G. M. Maher, J. M. Nerbonne, "Vascular actions of 'caged' phenylephrine analogs depend on the structure and site of attachment of the 2-nitrobenzyl group", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, *41*, 233-244; (b) J. W. Walker, H. Martin, F. R. Schmitt, R. J. Barsotti, "Rapid Release of an α -Adrenergic Receptor Ligand from Photolabile Analogues", *Biochemistry* **1993**, *32*, 1338-1345; (c) S. Muralidharan, G. M. Maher, W. A. Boyle, J. M. Nerbonne, "Caged phenylephrine: development and application to probe the mechanism of alpha-receptor-mediated vasoconstriction", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5199-5203.
- [58] T. H. Lee, K. R. Gee, E. H. Ellinwood, F. J. Seidler, "Combining 'caged-dopamine' photolysis with fast-scan cyclic voltammetry to assess dopamine clearance and release autoinhibition in vitro", *J. Neurosci. Methods* **1996**, *67*, 221-231.
- [59] (a) A. M. S. Soares, S. P. G. Costa, M. S. T. Goncalves, "2-Oxo-2H-benzo[h]benzopyran as a new light sensitive protecting group for neurotransmitter amino acids", *Amino Acids* **2010**, *39*, 121-133; (b) V. R. Shembekar, Y. L. Chen, B. K. Carpenter, G. P. Hess, "Coumarin-caged glycine that can be photolyzed within 3 μ s by visible light", *Biochemistry* **2007**, *46*, 5479-5484; (c) A. P. Billington, K. M. Walstrom, D. Ramesh, A. P. Guzikowski, B. K. Carpenter, G. P. Hess, "Synthesis and photochemistry of photolabile N-glycine derivatives and effects of one on the glycine receptor", *Biochemistry* **1992**, *31*, 5500-5507.
- [60] M. J. G. Fernandes, M. S. T. Goncalves, S. P. G. Costa, "Neurotransmitter amino acid-oxobenzo[f]benzopyran conjugates: synthesis and photorelease studies", *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11175-11179.

- [61] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer, J. Wirz, "Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP", *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4581-4595.
- [62] N. Senda, A. Momotake, T. Arai, "Synthesis and photocleavage of 7-{bis(carboxymethyl)amino}coumarin-4-yl methyl-caged neurotransmitters", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, 80, 2384-2388.
- [63] (a) E. Fino, R. Araya, D. S. Peterka, M. Salierno, R. Etchenique, R. Yuste, "RuBi-Glutamate: two-photon and visible-light photoactivation of neurons and dendritic spines", *Front. Neural. Circuits* **2009**, 3, 1-9; (b) M. Salierno, E. Marceca, D. S. Peterka, R. Yuste, R. Etchenique, "A fast ruthenium polypyridine cage complex photoreleases glutamate with visible or IR light in one and two photon regimes", *J. Inorg. Biochem.* **2010**, 104, 418-422.
- [64] J.-C. David, J.-F. Coulon, "Octopamine in invertebrates and vertebrates. A review", *Prog. Neurobiol.* **1985**, 24, 141-185.
- [65] J. G. Malamud, A. P. Mizisin, R. K. Josephson, "The effects of octopamine on contraction kinetics and power output of a locust flight muscle", *J. Comp. Physiol., A* **1988**, 162, 827-835.
- [66] M. S. Livingstone, R. M. Harris-Warrick, E. A. Kravitz, "Serotonin and Octopamine Produce Opposite Postures in Lobsters", *Science* **1980**, 208, 76-79.
- [67] (a) B. D. Burrell, B. H. Smith, "Modulation of the honey bee (*Apis mellifera*) sting response by octopamine", *J. Insect Physiol.* **1995**, 41, 671-680; (b) R. Menzel, U. Müller, "Learning and Memory in Honeybees: From Behavior to Neural Substrates", *Annu. Rev. Neurosci.* **1996**, 19, 379-404.
- [68] (a) G. Braun, G. Bicker, "Habituation of an appetitive reflex in the honeybee", *J. Neurophysiol.* **1992**, 67, 588-598; (b) J. Erber, P. Kloppenburg, A. Scheidler, "Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology", *Cell. Mol. Life Sci.* **1993**, 49, 1073-1083; (c) B. Pribbenow, J. Erber, "Modulation of Antennal Scanning in the Honeybee by Sucrose Stimuli, Serotonin, and Octopamine: Behavior and Electrophysiology", *Neurobiol. Learn. Mem.* **1996**, 66, 109-120; (d) D. J. Schulz, G. E. Robinson, "Octopamine influences division of labor in honey bee colonies", *J. Comp. Physiol., A* **2001**, 187, 53-61; (e) R. Scheiner, S. Plückhahn, B. Öney, W. Blenau, J. Erber, "Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees", *Behav. Brain Res.* **2002**, 136, 545-553.
- [69] M. D. Berry, "Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators", *J. Neurochem.* **2004**, 90, 257-271.
- [70] W. Blenau, S. Balfanz, A. Baumann, "Amtyr1: Characterization of a Gene from Honeybee (*Apis mellifera*) Brain Encoding a Functional Tyramine Receptor", *J. Neurochem.* **2000**, 74, 900-908.
- [71] I. Orchard, J. M. Ramirez, A. B. Lange, "A Multifunctional Role for Octopamine in Locust Flight", *Annu. Rev. Entomol.* **1993**, 38, 227-249.
- [72] M. E. Bitterman, R. Menzel, A. Fietz, S. Schafer, "Classical Conditioning of Proboscis Extension in Honeybees (*Apis mellifera*)", *J. Comp. Physiol.* **1983**, 97, 107-119.
- [73] R. A. Rescorla, Wagner, A. R., "A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement"; New York: Appleton-Century-Crofts, **1972**, 64-99.
- [74] M. Hammer, "An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees", *Nature* **1993**, 366, 59-63.
- [75] M. Hammer, R. Menzel, "Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees", *Learn. Memory* **1998**, 5, 146-156.
- [76] R. Menzel, G. Leboulle, D. Eisenhardt, "Small brains, bright minds", *Cell* **2006**, 124, 237-239.

- [77] M. Giurfa, "Associative learning: The instructive function of biogenic amines", *Curr. Biol.* **2006**, *16*, R892-R895.
- [78] (a) W. Blenau, A. Baumann, "Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*", *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2001**, *48*, 13-38; (b) T. Roeder, "Octopamine in invertebrates", *Prog. Neurobiol.* **1999**, *59*, 533-561.
- [79] L. Grohmann, W. Blenau, J. Erber, P. R. Ebert, T. Strünker, A. Baumann, "Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain", *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 725-735.
- [80] (a) W. Schultz, "Behavioral Theories and the Neurophysiology of Reward", *Annu. Rev. Psychol.* **2006**, *57*, 87-115; (b) P. N. Tobler, A. Dickinson, W. Schultz, "Coding of predicted reward omission by dopamine neurons in a conditioned inhibition paradigm", *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 10402-10410; (c) W. X. Pan, R. Schmidt, J. R. Wickens, B. I. Hyland, "Tripartite mechanism of extinction suggested by dopamine neuron activity and temporal difference model", *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 9619-9631.
- [81] (a) T. H. Lee, K. R. Gee, C. Davidson, E. H. Ellinwood, "Direct, real-time assessment of dopamine release autoinhibition in the rat caudate-putamen", *Neuroscience* **2002**, *112*, 647-654; (b) T. H. Lee, K. R. Gee, E. H. Ellinwood, F. J. Seidler, "Altered cocaine potency in the nucleus accumbens following 7-day withdrawal from intermittent but not continuous treatment: voltammetric assessment of dopamine uptake in the rat", *Psychopharmacology* **1998**, *137*, 303.
- [82] (a) C. H. F. Rowell, "The orthopteran descending movement detector (DMD) neurones: a characterisation and review", *Z. vergl. Physiology* **1971**, *73*, 167-194; (b) A. M. Terlaak, J. Venhorst, G. Denkelder, H. Timmerman, "The Histamine H₁-Receptor Antagonist Binding Site. A Stereoselective Pharmacophoric Model Based upon (Semi-)Rigid H₁-Antagonists and Including a Known Interaction Site on the Receptor", *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3351-3360.
- [83] T. Roeder, J. Degen, M. Gewecke, "Epinastine, a highly specific antagonist of insect neuronal octopamine receptors", *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *349*, 171-177.
- [84] K. Marter, Diploma thesis, Freie Universität Berlin, **2009**.
- [85] F. Locatelli, G. Bundrock, U. Müller, "Focal and temporal release of glutamate in the mushroom bodies improves olfactory memory in *Apis mellifera*", *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 11614-11618.
- [86] (a) A. P. Grollman, "Inhibitors of Protein Biosynthesis II. Mode of action of anisomycin", *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 3226-3233; (b) M. Barbacid, D. Vazquez, "Ribosome Changes During Translation", *J. Mol. Biol.* **1975**, *93*, 449-463.
- [87] (a) L. C. Mahadevan, D. R. Edwards, "Signaling and superinduction", *Nature* **1991**, *349*, 747-748; (b) D. R. Edwards, L. C. Mahadevan, "Protein-synthesis inhibitors differentially superinduce *c-fos* and *c-jun* by 3 distinct mechanisms - lack of evidence for labile repressors", *EMBO J.* **1992**, *11*, 2415-2424.
- [88] M. Goard, G. Aakalu, O. D. Fedoryak, C. Quinonez, J. St Julien, S. J. Poteet, E. M. Schuman, T. M. Dore, "Light-mediated inhibition of protein synthesis", *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 685-693.
- [89] O. Sadovski, A. S. I. Jaikaran, S. Samanta, M. R. Fabian, R. J. O. Dowling, N. Sonenberg, G. A. Woolley, "A collection of caged compounds for probing roles of local translation in neurobiology", *Biorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7746-7752.
- [90] A. P. Grollman, "Inhibitors of Protein Biosynthesis", *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4089-4094.
- [91] (a) C. J. Stearman, M. Wilson, A. Padwa, "Conjugate Addition-Dipolar Cycloaddition Cascade for the Synthesis of Benzo[a]quinolizine and Indolo[a]quinolizine Scaffolds: Application to the Total Synthesis of (+/-)-Yohimbenone", *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3491-3499; (b) L. E. Tietze, N. Rackelmann, I. Müller, "Enantioselective total syntheses of the Ipecacuanha alkaloid emetine,

- the Alangium alkaloid tubulosine and a novel benzoquinolizidine alkaloid by using a domino process*", *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2722-2731.
- [92] M. Lee, "Ipecacuanha: the South American vomiting root", *J. R. Coll. Physicians Edinb.* **2008**, *38*, 355-360.
- [93] A. Jimenez, L. Carrasco, D. Vazquez, "Enzymic and Nonenzymic Translocation by Yeast Polysomes. Site of Action of a Number of Inhibitors", *Biochemistry* **1977**, *16*, 4727-4730.
- [94] (a) A. K. Abbas, M. Dozmorov, R. Li, F. S. Huang, F. Hellberg, J. Danielson, Y. Tian, J. Ekstrom, M. Sandberg, H. Wigstrom, "Persistent LTP without triggered protein synthesis", *Neurosci. Res.* **2009**, *63*, 59-65; (b) N. Stollhoff, R. Menzel, D. Eisenhardt, "Spontaneous recovery from extinction depends on the reconsolidation of the acquisition memory in an appetitive learning paradigm in the honeybee (*Apis mellifera*)", *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 4485-4492; (c) N. Stollhoff, R. Menzel, D. Eisenhardt, "One retrieval trial induces reconsolidation in an appetitive learning paradigm in honeybees (*Apis mellifera*)", *Neurobiol. Learn. Mem.* **2008**, *89*, 419-425.
- [95] (a) J. G. McCarron, T. C. Muir, "Mitochondrial regulation of the cytosolic Ca^{2+} concentration and the $InsP_3$ -sensitive Ca^{2+} store in guinea-pig colonic smooth muscle", *J. Physiol.* **1999**, *516*, 149-161; (b) H. R. Kaback, J. P. Reeves, S. A. Short, F. J. Lombardi, "Mechanisms of Active Transport in Isolated Bacterial Membrane Vesicles XVIII. The Mechanism of Action of Carbonylcyanide *m*-Chlorophenylhydrazone", *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *160*, 215-222.
- [96] R. Planells-Cases, T. J. Jentsch, "Chloride channelopathies", *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1792*, 173-189.
- [97] D. Gaskova, B. Brodska, A. Holoubek, K. Sigler, "Factors and processes involved in membrane potential build-up in yeast: *diS-C₃(3)* assay", *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 575-584.
- [98] (a) U. B. Kaupp, N. D. Kashikar, I. Weyand, "Mechanisms of sperm chemotaxis", *Annu. Rev. Physiol.* **2008**, *70*, 93-117; (b) M. E. Teves, F. Barbano, H. A. Guidobaldi, R. Sanchez, W. Miska, L. C. Giojalas, "Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa", *Fertil. Steril.* **2006**, *86*, 745-749; (c) S. Publicover, C. V. Harper, C. Barratt, " $[Ca^{2+}]_i$ signalling in sperm - making the most of what you've got", *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 235-242; (d) M. Eisenbach, L. C. Giojalas, "Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg", *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, *7*, 276-285.
- [99] (a) M. Spehr, G. Gisselmann, A. Poplawski, J. A. Riffell, C. H. Wetzel, R. K. Zimmer, H. Hatt, "Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis", *Science* **2003**, *299*, 2054-2058; (b) S. Bartram, W. Boland, "Der beschwerliche Weg zum Ei: immer der Nase nach", *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4877-4879.
- [100] R. Axel, "Geruch und Empfindung: eine molekulare Logik der olfaktorischen Wahrnehmung (Nobel-Vortrag)", *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6264-6282.
- [101] M. Spehr, H. Hatt, "hOR17-4 as a potential therapeutic target", *Drug News Perspec.* **2004**, *17*, 165-171.
- [102] T. Strunker, N. Goodwin, C. Brenker, N. D. Kashikar, I. Weyand, R. Seifert, U. B. Kaupp, "The *CatSper* channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm", *Nature* **2011**, *471*, 382-386.
- [103] A. Gakamsky, L. Armon, M. Eisenbach, "Behavioral response of human spermatozoa to a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides", *Human Reproduction* **2009**, *24*, 1152-1163.
- [104] F. Kilic, Dissertation, Freie Universität Berlin, **2010**.
- [105] M. Adamczyk, M. Cornwell, J. Huff, S. Rege, T. V. S. Rao, "Novel 7-hydroxycoumarin based fluorescent labels", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1985-1988.

- [106] (a) B. Y. Wang, X. Y. Liu, Y. L. Hu, Z. X. Su, "Synthesis and photophysical behavior of a water-soluble coumarin-bearing polymer for proton and Ni^{2+} ion sensing", *Polym. Int.* **2009**, *58*, 703-709; (b) M. M. Garazd, Y. L. Garazd, S. V. Shilin, V. P. Khilya, "Modified Coumarins. II. Mannich Reaction of Substituted 4-Phenylcoumarins", *Chem. Nat. Compd.* **2000**, *36*, 485-492; (c) C. A. Kontogiorgis, D. J. Hadjipavlou-Litina, "Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives", *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6400-6408.
- [107] K. Ito, J. Maruyama, "Studies on Stable Diazoalkanes as Potential Fluorogenic Reagents. 1. 7-Substituted 4-Diazomethylcoumarins", *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 3014-3023.
- [108] J. H. Ni, D. A. Auston, D. A. Freilich, S. Muralidharan, E. A. Sobie, J. P. Y. Kao, "Photochemical gating of intracellular Ca^{2+} release channels", *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5316-5317.
- [109] J.-Y. Chang, M.-F. Yang, C.-Y. Chang, C.-M. Chen, C.-C. Kuo, J.-P. Liou, "2-Amino and 2'-Aminocombretastatin Derivatives as Potent Antimitotic Agents", *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6412-6415.
- [110] (a) G. R. Pettit, M. P. Grealish, M. K. Jung, E. Hamel, R. K. Pettit, J. C. Chapuis, J. M. Schmidt, "Antineoplastic agents. 465. Structural modification of resveratrol: Sodium resverastatin phosphate", *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2534-2542; (b) M. Roberti, D. Pizzirani, D. Simoni, R. Rondanin, R. Baruchello, C. Bonora, F. Buscemi, S. Grimaudo, M. Tolomeo, "Synthesis and Biological Evaluation of Resveratrol and Analogues as Apoptosis-Inducing Agents", *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3546-3554.
- [111] (a) M. Schlosser, K. F. Christmann, "Olefinierungen mit Phosphor-Yliden, I. Mechanismus und Stereochemie der Wittig-Reaktion", *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1967**, *708*, 1-35; (b) M. Schlosser, K.-F. Christmann, A. Piskala, "Olefinierungen mit Phosphor-Yliden, II. β -Oxidophosphor-ylide (Betain-Ylide) in salzfreiem und salzhaltigem Medium", *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2814-2820.
- [112] J. Yu, M. J. Gaunt, J. B. Spencer, "Convenient Preparation of trans-Arylalkenes via Palladium(II)-Catalyzed Isomerization of cis-Arylalkenes", *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4627-4629.
- [113] H.-J. Bestmann, R. Armsen, H. Wagner, "Reaktionen mit Phosphinalkylenen, XXIV. Oxydation von Phosphinalkylenen mit Perjodat. Synthesemöglichkeiten für α,β -Dicarbonylverbindungen, Olefine und polycyclische Verbindungen", *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 2259-2269.
- [114] (a) G. Opitz, T. Ehlis, K. Rieth, "Symmetrische Alkene über Episulfone aus primären Sulfonylchloriden", *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3131-3132; (b) J. Nakayama, M. Tanuma, Y. Honda, M. Hoshino, "Reaction of Arylmethanesulfonyl and Styrylmethanesulfonyl Chlorides with Triethylamine", *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4553-4556; (c) E. Wedekind, D. Schenk, "Über das Verhalten von Sulfochloriden gegen starke Tertiärbasen", *Ber. deutsch. chem. Ges.* **1911**, *44*, 198-202.
- [115] A. Chatterjee, T. H. Bennur, N. N. Joshi, "Truly catalytic and enantioselective pinacol coupling of aryl aldehydes mediated by chiral Ti(III) complexes", *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5668-5671.
- [116] S. C. Jha, N. N. Joshi, "Aluminium-SALEM complex: a new catalyst for the enantioselective Michael reaction", *Tetrahedron-Asymmetry* **2001**, *12*, 2463-2466.
- [117] D. D'Addona, C. G. Bochet, "Preparation of carbamates from amines and alcohols under mild conditions", *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5227-5229.
- [118] J. Schaal, N. Kotzur, B. Dekowski, J. Quilitz, M. Klimakow, P. Wessig, V. Hagen, "A novel photorearrangement of (coumarin-4-yl)methyl phenyl ethers", *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, *208*, 171-179.
- [119] V. Uryga-Polowy, D. Kosslick, C. Freund, J. Rademann, "Resin-Bound Aminofluorescein for C-Terminal Labeling of Peptides: High-Affinity Polarization Probes Binding to Polyproline-Specific GYF Domains", *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2452-2462.

- [120] J. S. S. Demelo, R. S. Becker, A. L. Macanita, "Photophysical Behavior of Coumarins as a Function of Substitution and Solvent: Experimental Evidence for the Existence of a Lowest Lying $1(n\pi^*)$ State", *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6054-6058.
- [121] S. E. Braslavsky, "Glossary of terms used in photochemistry - 3^d edition (IUPAC recommendations 2006)", *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 293-465.
- [122] T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurahashi, M. Iwamura, R. Y. Tsien, "Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photoreleasable cyclic nucleotides for both one- and two-photon excitation", *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1119-1128.
- [123] H. G. O. Becker, "Einführung in die Photochemie", Dt. Verlag d. Wiss. Berlin **1991**.
- [124] (a) J. Bendig, D. Kreysig, R. Schoneich, "Der Einfluß der Bandbreite des Anregungslichtes bei der Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten", *Zeitschr. f. Chem.* **1979**, *19*, 151-152; (b) W. Rettig, "Ladungstrennung in angeregten Zuständen entkoppelter Systeme – TICT-Verbindungen und Implikationen für die Entwicklung neuer Laserfarbstoffe sowie für den Primärprozeß von Sehvorgang und Photosynthese", *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 969-986.
- [125] G. Jones, W. R. Jackson, C. Choi, W. R. Bergmark, "Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism", *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 294-300.
- [126] G. M. Huitink, D. P. Poe, H. Diehl, "Properties of calcein-blue", *Talanta* **1974**, *21*, 1221-1229.
- [127] V. Hagen, S. Frings, B. Wiesner, S. Helm, U. B. Kaupp, J. Bendig, "7-(dialkylamino)coumarin-4-yl methyl-caged compounds as ultrafast and effective long-wavelength phototriggers of 8-bromo-substituted cyclic nucleotides", *ChemBioChem* **2003**, *4*, 434-442.
- [128] S. Balfanz, T. Strünker, S. Frings, A. Baumann, "A family of octapamine receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca^{2+} release in *Drosophila melanogaster*", *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 440-451.
- [129] K. Marter In *7th Forum of European Neuroscience* Amsterdam, Netherlands, 2010; 5. Ausg.
- [130] W. H. Melhuish, "Modified Technique for Determining the Wavelength-Sensitivity Curve of a Spectrofluorimeter", *Appl. Opt.* **1975**, *14*, 26-27.
- [131] D. F. Eaton, "Reference materials for fluorescence measurement", *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1107-1114.
- [132] (a) C. Grewer, H. D. Brauer, "Temperature dependence of the oxygen quenching of $\pi\pi^*$ -singlet and $\pi\pi^*$ -triplet states of singlet oxygen sensitizers", *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 5001-5006; (b) R. P. Herbrich, R. Schmidt, "Investigation of the pyrene/*N,N'*-diethylaniline exciplex by photoacoustic calorimetry and fluorescence spectroscopy", *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2000**, *133*, 149-158.
- [133] Weiying Lin, Lingliang Long, Jianbo Feng, B. Wang, C. Guo, "Synthesis of meso-Coumarin-Conjugated Porphyrins and Investigation of Their Luminescence Properties", *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *26*, 4301-4304.

7 Anhang

Publikationen in Fachzeitschriften

J. Schaal, N. Kotzur, B. Dekowski, J. Quilitz, M. Klimakow, P. Wessig, V. Hagen

“A novel photorearrangement of (coumarin-4-yl)methyl phenyl ethers“

J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2009, **208**, 171-179

V. Hagen, F. Kilic, J. Schaal, B. Dekowski, R. Schmidt, N. Kotzur

“[8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl]methyl moieties as photo-removable protecting groups for compounds with COOH, NH₂, OH, and C=O functions“

J. Org. Chem. 2010, **75**, 2790-2797

Vorträge und Poster

Poster

“Photochemical Rearrangement of [(Coumarin-4-yl)methyl] Phenyl Ethers“

22nd IUPAC Symposium on Photochemistry

07-08/2008, Göteborg, Schweden

“Photochemical Rearrangement of [(Coumarin-4-yl)methyl] Phenyl Ethers“

10th PhD Retreat of the MDC and FMP

09/2008, Döllnsee, Deutschland

„Coumarinylmethyl-caged biogenic amines“

15th International Congress on Photobiology (ICP 2009)

06/2009, Düsseldorf, Deutschland

„Coumarinylmethyl-caged biogenic amines“

11th PhD Retreat of the MDC and FMP

09/2009, Kremmen, Deutschland

„Coumarinylmethyl-caged biogenic amines“

"Central European Conference on Photochemistry" (CECP 2010)

02/2010, Bad Hofgastein, Österreich

„Coumarinylmethyl-caged protein synthesis inhibitors“

EMBO Conference Series-Chemical Biology 2010

09/2010, EMBL Heidelberg, Germany

Vorträge

„*Coumarinylmethyl-caged biogenic amines*“

15th International Congress on Photobiology (ICP 2009)

06/2009, Düsseldorf, Deutschland

Eidesstattliche Erklärung

Die selbständige und eigenhändige Anfertigung ohne unerlaubte Hilfsmittel versichere ich an Eides statt.

Kooperationen mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern sowie bereits publizierte Teilergebnisse der Dissertation sind in der Arbeit aufgeführt.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form an keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient. Ich erkläre hiermit die Kenntnis der dem angestrebten Verfahren zugrundeliegenden Promotionsordnung vom 27.04.2004.

Potsdam, im August 2011

A handwritten signature in cursive script that reads "Janina Schaal".

Janina Schaal