

Institut für Chemie
Professur für Bioorganische Chemie

Funktionalisierte OS(T)K-Stäbe und Sensorfluorophore zur optischen Sensorik

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Organische Chemie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Nicole Behrends
geboren am 31.08.1988 in Burg (bei Magdeburg)
Potsdam, Juni 2017

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-404213
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-404213>

"Life is a journey, not a destination."

Ralph W. Emerson

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Zielstellung.....	4
3	Theoretische Grundlagen	6
3.1	Molekulare Stäbe	6
3.1.1	Oligospiroketale (OSK)	6
3.1.2	Oligospirothioketale (OSTK)	11
3.2	Fluoreszenz	12
3.2.1	Fluoreszenzlebensdauer und -quantenausbeute.....	14
3.2.2	Fluoreszenzlöschung	16
3.2.3	Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	18
3.2.4	Fluoreszenzanisotropie	22
3.3	Moderne Methoden der Fluoreszenzmikroskopie	25
3.4	Zweiphotonenabsorption	27
3.5	Sensorfluorophore	30
3.5.1	Speicheldrüsen	33
4	Ergebnisdiskussion.....	35
4.1	Sensor-OS(T)K-Stäbe	35
4.1.1	Coumarinsynthese.....	35
4.1.2	Spektroskopische Eigenschaften der Coumarine.....	41
4.1.3	DBD-Synthese.....	42
4.1.4	Spektroskopische Eigenschaften von DBD-Derivate 24 und 27	51
4.1.5	FRET-Paar Testsystem	52
4.1.6	Synthese eines FRET-Paar Testsystems.....	52
4.1.7	Spektroskopische Eigenschaften des FRET-Paares 64	53
4.1.8	Synthese der einfach-markierten OSK-Stäbe.....	56
4.1.9	Synthese der einfach-markierten OSTK-Stäbe	57
4.1.10	Synthese der doppelt-markierten OSTK-Stäbe	59
4.1.11	Spektroskopische Eigenschaften der OSTK-Stäbe.....	61
4.1.12	FRET-Gelenkstab	71
4.1.13	Spektroskopische Eigenschaften der FRET-Gelenkstäbe	76
4.1.14	Stabverlängerungen	81

4.1.15	Funktionalisierung der Coumarin-Derivate.....	85
4.2	2P-FRET-Paar.....	86
4.2.1	Spektroskopische Eigenschaften des 2P-FRET-Paares	88
4.2.2	2P-Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie	90
4.3	Ca ²⁺ -Sensoren.....	92
4.3.1	Synthese der Ca ²⁺ -Sensoren	93
4.3.2	Spektroskopische Eigenschaften der Ca ²⁺ -Sensoren.....	97
4.3.3	Ca ²⁺ -Kalibrierung	99
4.3.4	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen <i>in vivo</i>	111
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	118
6	Experimentalteil.....	124
6.1	Allgemeines.....	124
6.1.1	Arbeitsweise, verwendete Lösungsmittel und Chemikalien	124
6.1.2	Chromatographische Methoden	124
6.1.3	Physikalische Messgeräte.....	125
6.1.4	Herleitungen.....	127
6.1.5	Präparation der Vesikel	127
6.2	Synthesvorschriften	128
7	Abkürzungsverzeichnis	196
8	Publikationen.....	199
9	Danksagung	200
10	Literaturverzeichnis	201
11	Ehrenwörtliche Erklärung	210

1 Einleitung

Das Verständnis über die vielen hochkomplexen Prozesse in lebenden Zellen scheint eine der größten Hürden der Wissenschaft zu sein. Es bringt Aufschluss über die Entstehung und Heilung von Krankheiten wie Mukoviszidose^[1] oder der Alzheimer-Krankheit^[2] und ermöglicht die Entwicklung neuer und besserer Medikamente. Schon geringe Abweichungen in den physiologischen Signalkaskaden können pathologische Konsequenzen haben. Daher ist es von großer Bedeutung, das räumlich-zeitliche Zusammenspiel sowohl von Molekülen (Enzymen, Antikörpern, DNA usw.) als auch von Ionen (Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ , K^+ , H^+) auf molekularer Ebene zu untersuchen und zu verstehen. Als eine der bedeutendsten Methoden zur Erforschung physiologischer Prozesse hat sich die Fluoreszenzspektroskopie erwiesen. Fluoreszenzfarbstoffe, kleine organische Moleküle, Quantenpunkte (*quantum dots*, QD)^[3] oder fluoreszierende Lanthanid-Komplexe^[4] eröffnen mit ihren variablen und breit gefächerten spektroskopischen Eigenschaften wie Absorptions- (λ_{abs}) und Emissionswellenlänge (λ_{em}), molarem Extinktionskoeffizient (ϵ), Quantenausbeute (ϕ_{F}) und Fluoreszenzlebensdauer (τ_{F}) ein breites Einsatzspektrum. Die Fülle an maßgeschneiderten Fluoreszenzsonden und empfindlichen Bildgebungsverfahren (z.B. STED-Mikroskopie^[5], FLIM^[6])¹ bieten hohe räumliche und zeitliche Auflösung bis hin zu Einzelmolekülmessungen. In dieser Dissertation werden zum einen neuartige optische Sonden zur Untersuchung von mechanischen Reizen an Zellmembranen und zum anderen Sensorfluorophore zur Untersuchung von Ca^{2+} -Konzentrationen im Zellgewebe dargestellt und diskutiert.

Mechanische Reize

Mechanische Reize spielen neben elektrischen, optischen und (bio)chemischen Reizen eine große Rolle bei der Zellentwicklung und beeinflussen diese von der Morphologie bis hin zur Genexpression. Zelluläre Prozesse wie Proliferation^[7], Differenzierung^[8], Anbinden von Muskelzellen^[9] oder der Aufbau von Knochengewebe^[8] (bereits im 19. Jahrhundert von WOLFF beschrieben)^[10] werden durch mechanische Reize gesteuert. Die genauen Mechanismen zur Wahrnehmung mechanischer Reize sind, im Gegensatz zu den anderen Reizklassen, kaum bekannt. Es wird vermutet, dass viele verschiedene Mechanosensoren an der Übertragung mechanischer Signale beteiligt sind. Involviert in die mechanochemische Transduktion sind u.a. die Extrazellulärmatrix, Membrankomponenten, spezialisierte Oberflächenfortsätze, Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion.^[11] Es wurden bereits mehrere mechanosensitive Elemente wie mechanosensitive Ionenkanäle oder membrangebundene Proteine entdeckt.^[12,13] Im Allgemeinen kann man zwischen exogenen und endogenen Kräften unterscheiden.

¹ STED = *stimulated emission depletion*, FLIM = Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy*)

Exogene Kräfte können durch Schwerkraft, Dehnung/ Stauchung, Spannung oder Scherung (durch Flüssigkeiten), endogene durch osmotischen Druck oder durch Proteine (z. B. Motorproteine) entstehen.^[14] Die Messung der Auswirkungen mechanischer Kräfte auf Zellen *in vivo* stellt eine große Herausforderung dar und bedarf innovativer experimenteller Messtechniken gekoppelt mit molekularen Sonden. Gängige Techniken zur Untersuchung von Kräften in Zellen wie mikrogefertigte Arrays^[15,16], Zugkraftmikroskopie^[17], Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy, AFM*)^[18], optische Pinzetten^[19,20], magnetische Pinzetten^[21] und DNA-basierte Kraftsensoren^[22] können weder für die Messung intrazellulärer und intramolekularer Kräfte in Echtzeit, noch für *in situ* Messungen in lebenden Zellen oder Tieren angewendet werden. Erst durch die Entwicklung von Fluoreszenzsonden, die auf dem Prinzip des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) beruhen, können Kräfte in lebenden Zellen zeitlich-räumlich aufgelöst im pico-Newton (pN)-Bereich verlässlich bestimmt werden.^[14,23] Beim FRET überträgt ein angeregter Fluorophor (Donor, D) seine Energie strahlungslos durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen zweiten Chromophor (Akzeptor, A). Die FRET-Effizienz ist von verschiedenen Bedingungen abhängig 1) Überlappungsintegral zwischen der Donoremission ($\lambda_{em,D}$) und Akzeptorabsorption ($\lambda_{abs,A}$), 2) Abstand zwischen Donor und Akzeptor (R) und 3) die relative Orientierung zueinander (Übergangsdipolmomente, κ^2). Oft bestehen FRET-basierte Kraftsensoren aus zwei Fluorophoren, die über einen elastischen Abstandshalter (Linker) verbunden sind. Als Fluorophore dienen in der Regel genetisch codierte (intrinsische) Fluoreszenzproteine (GFP-basierte Sonden)², die unter anderem durch Abstandshalter wie α -/ β -Helix^[24] oder Polypeptide miteinander verbunden sind. Wird die Orientierung oder der Abstand der Fluorophore zueinander durch Krafteinwirkung verändert, so ändert sich auch die FRET-Effizienz, wodurch die Krafteinwirkung quantitativ bestimmt werden kann.^[14] Es wurden bereits eine Vielzahl an genetisch codierten FRET-basierten Kraftsensoren entwickelt, um mechanische Kräfte in Strukturproteinen zu analysieren: Dehnungsempfindlicher FRET (stFRET)^[25,26], Spektrin-stFRET (sstFRET), Spannungssensor-Module (TSMoD)^[23,27] und cpstFRET^[28]. Neben den dargestellten intrinsischen Sensoren werden auch extrinsische FRET-Sensoren angewendet. Hier werden Donor und Akzeptor ebenfalls über einen Linker verbunden. In diesem Fall werden die Fluorophore z.B. einerseits an einer festen Oberfläche, andererseits an der Zelloberfläche (z. B. durch spezifische Bindung durch Antikörper-Antigen-Wechselwirkung) gebunden, um die Kräfte zwischen der Zelloberfläche und der Extrazellulärmatrix oder zwischen zwei Zellen zu überwachen.^[29] Das Prinzip der Kraftmessung beruht auch hier auf der Änderung der FRET-Effizienz. Der Abstandshalter, der das D-A-Paar verbindet, ist das Schlüsselement für den dynamischen Bereich der zugänglichen Kräfte. Um definierte Kraftimpulse in lebenden Zellen messen und korrekt bewerten zu können, ist es erforderlich, einen FRET-Sensor zunächst ausführlich hinsichtlich seiner spektralen Eigenschaften (z.B. molarer Extinktionskoeffizient (ϵ_A) des

² GFP = Grün Fluoreszierendes Protein

Akzeptors, Fluoreszenzquantenausbeute des Donors ($\phi_{F,D}$) für die Berechnung des Überlappintegrals (J), sowie deren Veränderung durch die Anbindung an einen Abstandshalter hinreichend zu untersuchen.

Sensorfluorophore

Die simultane Detektion mehrerer physiologisch relevanter Analyte (Multiplexing) stellt eine weitere Herausforderung dar, um komplexe physiologische Prozesse in Zellen zu verstehen. Als nichtinvasive und hoch sensitive Anwendung ist auch hier die Fluoreszenzspektroskopie die Methode der Wahl. Sensorfluorophore können hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität (I_F) oder Fluoreszenzlebensdauer (τ_F) in lebenden Zellen mikroskopisch untersucht werden. Die Fluoreszenzlebensdauer hat im Vergleich zur Fluoreszenzintensität jedoch den entscheidenden Vorteil, dass sie unabhängig von der Konzentration des Fluorophors ist. Denn diese kann durch diverse Einflüsse während der Messung (z.B. Photobleichen, Farbstoff-Extrusion) sehr stark variieren. Mittels Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie (FLIM) lassen sich Ionenkonzentrationen unterschiedlicher Analyte (Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ , H^+) in lebenden Zellen verlässlich einzeln oder simultan detektieren.^[30-34] Als Grundlage werden hoch empfindliche, ionensensitive Fluorophore benötigt, deren spektrale Eigenschaften (Spektralbereich, Lebenszeit) hinreichend voneinander unterscheidbar sind (Querempfindlichkeit).^[35,36] Auf der Suche nach neuen innovativen Sensorfluorophoren rücken vor allem Fluorophore mit herausragenden Fluoreszenzeigenschaften in den Vordergrund, um die einzelnen Sensorfluorophore ausreichend voneinander abzugrenzen. WESSIG *et al.* entwickelten 2011 eine neue Klasse an Fluoreszenzfarbstoffen mit herausragenden photophysikalischen Eigenschaften, die in dieser Kombination nur selten auftreten. Es handelt sich um sogenannte DBD-Farbstoffe, deren Chromophor auf ein [1,3]-Dioxolo[4,5-*f*][1,3]benzodioxol-Gerüst aufbaut (Abbildung 1). Durch Einführung von elektronenziehenden Gruppen (EWGs, *electron withdrawing groups*) am Aromaten, lassen sich die Fluoreszenzeigenschaften breit variieren. Das reine DBD-Grundgerüst fluoresziert dagegen nicht.^[37,38]

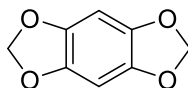


Abbildung 1. DBD-Gerüst.

DBD-Farbstoffe sind charakterisiert durch einen großen STOKES-Shift ($\lambda_{em} - \lambda_{abs} > 100 \text{ nm}$), kombiniert mit langen Fluoreszenzlebensdauern ($\tau_F > 20 \text{ ns}$) und außergewöhnlicher Bleichstabilität. Sie finden bereits für unterschiedliche bioanalytische Untersuchungen als Fluoreszenzsonden Anwendung^[38-41] und sollen in dieser Dissertation unter anderem auf die Verwendung als Ca^{2+} -sensitive Fluorophore analysiert werden.

2 Zielstellung

Mechanische Reize

Für die Sensorik von mechanischen Reizen sollen innovative optische Sonden auf der Grundlage von Oligospiroketalen (OSK)^[38,42] entwickelt werden, die durch das Donor-Akzeptor-System (FRET-Paar) Coumarin und DBD^[38] charakterisiert sind (Abbildung 2). Dafür sollen unterschiedliche Modellsysteme aus einem Pool von Fluorophoren und OSK-Stabbausteinen („Werkzeugkasten-Prinzip“) synthetisiert und detailliert photophysikalisch untersucht werden.

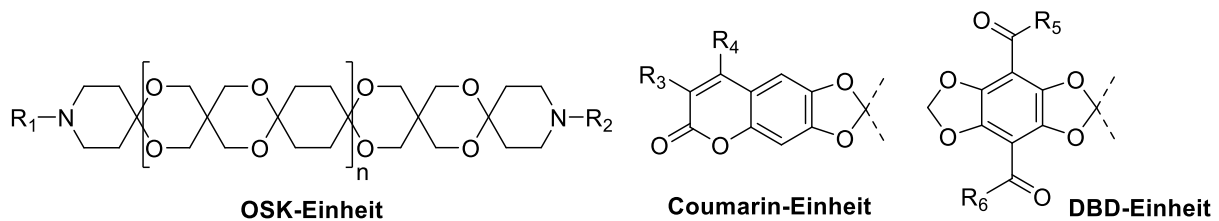


Abbildung 2. Allgemeine Strukturen von OSK, Coumarin und DBD.

Die für kraftbasierte FRET-Sensoren standardmäßig verwendeten Abstandshalter sind Biomakromoleküle (DNA oder Polypeptide), die entsprechend große molekulare Dimensionen erreichen können. Durch ihre vielfältigen Funktionalitäten können sie mit den Fluoreszenzsonden oder ihrer Umgebung in Wechselwirkungen treten und so zu Veränderungen der beobachteten Farbstofffluoreszenz führen. Im Falle von Abstandshaltern aus DNA kann es zur Interkalation (Einlagerung des Farbstoffes zwischen die Basenpaare ohne kovalente Bindung) der Farbstoffe kommen, wodurch der Donor-Akzeptor-Abstand nicht mehr eindeutig bestimmbar ist.^[43] Des Weiteren ist bekannt, dass die Nucleobase Guanin, aufgrund ihres geringen Oxidationspotentials, zur Löschung der Farbstofffluoreszenz durch photoinduzierten Elektronentransfer (PET) neigt, was wiederum zur Verfälschung des FRET-Signals führt.^[44] Durch die Verwendung der OSK-Stäbe als neue Klasse von Abstandshaltern werden diese Effekte drastisch reduziert. Aufgrund der vergleichsweise hydrophoben Oberfläche lassen sich OSK-Stäbe leicht in Membranen oder Membran-Modellen aus Liposomen einbauen (molekularer „Anker“).^[45]

Die Modellsysteme sollen auf den Strukturmotiven „Fluorophor“, „Verbinder“ und „Abstandshalter“, wie in Abbildung 3 dargestellt, basieren. Durch den Einsatz von A) neuen Fluorophoren (DBD), B) flexiblen oder starren Verbindern und C) rigiden, aber dennoch von den Dimensionen kleinen Abstandshaltern (OSK), wird eine neue Klasse von fluoreszierenden Sensor-Stäben eingeführt. Die Struktur motive sollen über den Werkzeugkasten miteinander variiert und die einzelnen Sensor-Stäbe photophysikalisch miteinander verglichen werden.

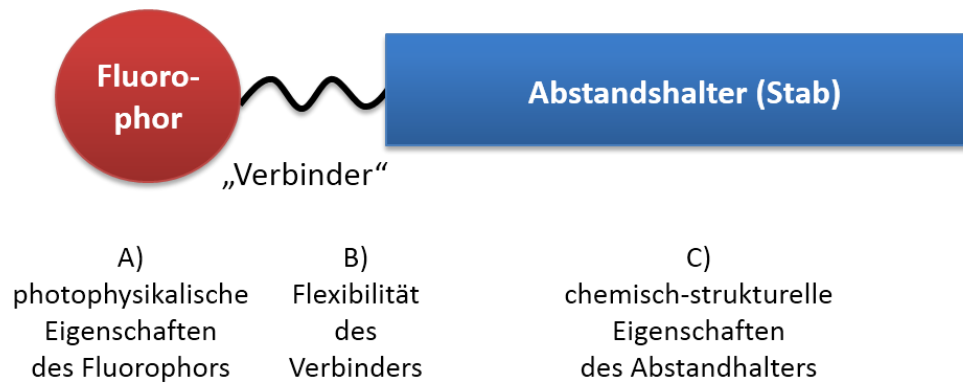


Abbildung 3. Generelle Struktur motive der Sensor-Stäbe.

Es sollen drei Arten von Sensoren hergestellt werden:

- i) das FRET-Paar Coumarin-DBD mit einem flexiblen Abstandshalter als erstes Modell für das FRET-System
- ii) einfach- und doppelt-markierte Sensor-OSK-Stäbe mit variabler Länge und flexiblen sowie starren Verbindern
- iii) doppelt-markierte Sensor-OSK-Gelenkstäbe^[46], die eine definierte Flexibilität der Stabenden gewähren.

Nähere Erläuterungen zum Unterschied zwischen doppelt-markierten Sensor-OSK-Stäben, deren Verbinder einerseits flexibel andererseits starr ist, folgen im Abschnitt 3.2.3.

Sensorfluorophore

Um die Dynamik von Ca^{2+} -Konzentrationen in lebenden Zellen zu detektieren, soll ein Sensorfluorophor aufbauend auf einem DBD-Fluoreszenzfarbstoff und dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA (1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Abbildung 4) synthetisiert werden. Der Ca^{2+} -Sensor soll zunächst spektroskopisch charakterisiert werden. Mittels FLIM soll der Sensorfluorophor daraufhin in lebenden Speicheldrüsen der Schabe *P. AMERICANA* auf seine Ca^{2+} -Sensitivität hin überprüft werden.

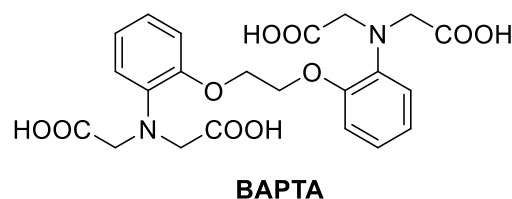


Abbildung 4. Strukturformel von BAPTA.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Molekulare Stäbe

Aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften sind Molekulare Stäbe seit einigen Jahrzehnten Gegenstand vielseitiger wissenschaftlicher Anwendungen auf den Gebieten der Bio- und Nanowissenschaften. Durch ihre starre Konformation, ihr großes Seitenverhältnis (Länge/Breite) und ihre Formbeständigkeit dienen sie z.B. als starre Abstandshalter zwischen zwei funktionalisierten Molekülen, als Ionenkanäle und Poren in Membranen oder werden für den Ladungs- und Energietransfer (konjugierte Stäbe) eingesetzt.^[47–51] Für den Aufbau von molekularen Stäben dienen unterschiedlichste Gerüstsubstanzen. Meist werden ungesättigte Kohlenwasserstoffe wie Benzol (I), Thiophen (II), Pyrrol (III) oder Ethen (IV) verwendet, die zum Teil ein durchgängig konjugiertes Gerüst erzeugen.^[47] Vertreter aus gesättigten Kohlenwasserstoffen bestehen unter anderem aus Cyclobutanen (V) oder Cyclohexanen (VI) (Abbildung 5).

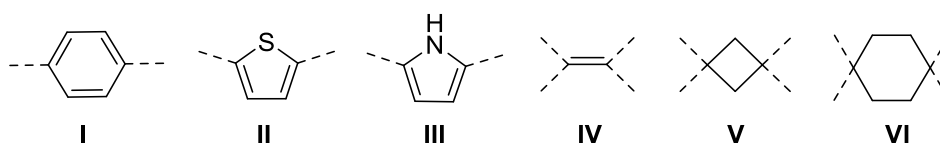


Abbildung 5. Grundbausteine molekularer Stäbe.

Neben einem effizienten synthetischen Zugang sind der Einbau von variablen funktionellen Gruppen und die flexible Anpassung der Löslichkeit wichtige und oft schwer zugängliche Variablen, die die Anwendbarkeit von molekularen Stäben begrenzen.

3.1.1 Oligospiroketale (OSK)

Oligospiroketale (OSK) bestehen aus einem gesättigten Grundgerüst und beschreiben eine neue Klasse an molekularen Stäben, die 2007 erstmals von WESSIG *et al.* vorgestellt wurde.^[52] Erste OSK-Grundgerüste sind schon seit 1928 bekannt, wurden jedoch nicht einer spezifischen Gruppe zugeordnet.^[53,54] OSK-Stäbe lassen sich sehr variabel zusammensetzen und funktionalisieren. Die Grundstruktur besteht im Inneren aus 1,3-Dioxanen (rot) und Cyclohexanen (blau), die spirocyclisch miteinander verknüpft sind (Abbildung 6). Als Endstücke werden typischerweise Piperidine (grün) verwendet, über die verschiedenste Funktionalitäten an die OSK-Stäbe angebracht werden können, wie es in Abbildung 6 exemplarisch dargestellt ist. Obwohl das OSK-Gerüst reich an Sauerstoffatomen ist, sind OSK-Stäbe relativ hydrophob, da die Sauerstoffatome durch die angrenzenden Methylengruppen sterisch abgeschirmt werden. Daraus resultiert, dass die Löslichkeit der OSK-Stäbe ab einer Größe

von etwa 7 Ringen extrem abnimmt. Die Einführung von Löslichkeitsvermittelnden Gruppen, vorzugsweise in Form von sogenannten Muffen, für lange OSK-Stäbe ist daher unumgänglich. Es wurden bereits unterschiedlichste Muffen-Strukturen vorgestellt. Die bisher erfolgreichste Muffe basiert auf [1,3]-Dioxolo[4,5-*f*][1,3]benzodioxol (DBD, lila).^[55] Ausgehend von DBD-Muffen wurden im Arbeitskreis WESSIG auch die bereits erwähnten DBD-Farbstoffe konstruiert.

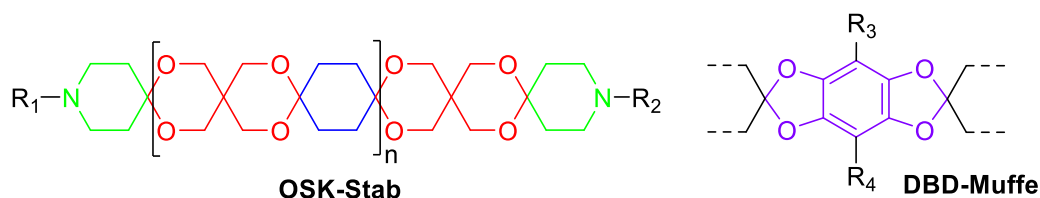


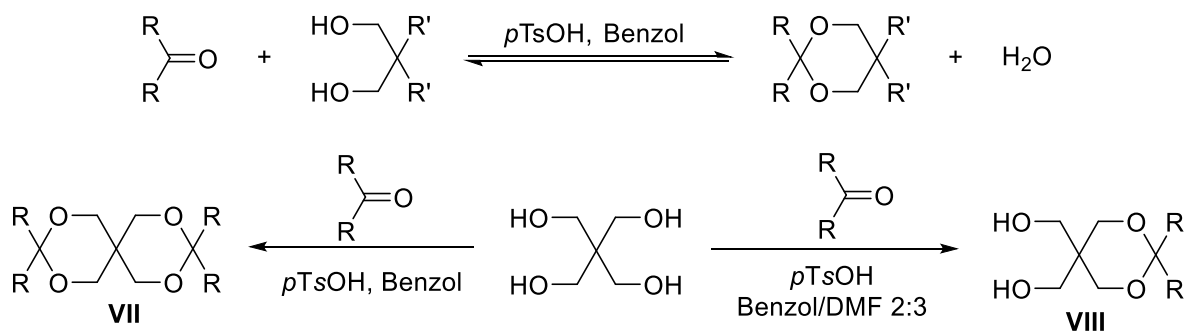
Abbildung 6. Struktur der OSK-Stäbe und DBD-Muffe.

Durch ihre Skalierbarkeit (Länge), ihre chemische Modifizierbarkeit und der gezielten Bestimmung des chemischen Charakters durch den Einbau von funktionellen Gruppen (für potentielle Wechselwirkungen mit der Umgebung oder den Einbau von Farbstoffen) können OSK-Stäbe ideal als minimal-invasive Transmembransonden eingesetzt werden, wie es bereits durch WESSIG *et al.* gezeigt wurde. Durch die Markierung mit Pyren konnten Agglomerationen der Stäbe ausgeschlossen werden.^[56–58] Des Weiteren wurden OSK-Stäbe bereits als Abstandshalter in FRET-Systemen^[59] und als Strukturelemente in porösen Materialien^[60] und Dendrimeren^[61] eingesetzt.

3.1.1.1 Acetalisierungsmethoden

Die Ketal-Strukturen der OSK-Stäbe können über drei unterschiedliche Acetalisierungsmethoden aufgebaut werden. Dazu zählen die klassische Acetalisierungsmethode, die NOYORI-Acetalisierung^[56] und die im Arbeitskreis WESSIG entwickelte Doppelaktivierungsmethode^[52]. Bei der klassischen Acetalisierungsmethode werden Carbonylverbindungen und Alkohole bei über 100 °C am Wasserabscheider nach DEAN und STARK mit LEWIS- oder BRØNSTED-Säuren (Katalysator) umgesetzt (Abbildung 7). Da es sich um eine mehrstufige Gleichgewichtsreaktion handelt, wird ein Edukt im Überschuss eingesetzt. Als Lösungsmittel dienen z.B. Toluol oder Benzol, die mit Wasser ein Azeotrop bilden.^[62] Wird ein zweifaches 1,3-Diol (z.B. Pentaerythritol) als Edukt eingesetzt, so bildet sich bevorzugt das symmetrische, diacetalisierte Produkt (**VII**). Wird ein Gemisch aus Benzol/DMF 2:3 verwendet, so lässt sich selektiv das monoacetalisierte Produkt (**VIII**) erzeugen.^[63]

klassische Acetalisierung:



Acetalisierung nach NOYORI:

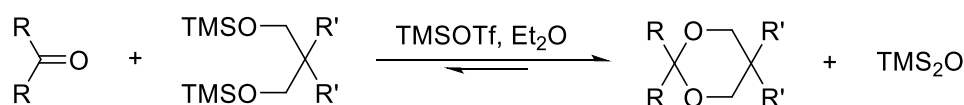


Abbildung 7. Klassische Acetalisierung und Acetalisierung nach NOYORI ($p\text{TsOH}$ = p -Toluolsulfonsäure).

Eine sehr viel mildere Variante stellt die NOYORI-Acetalisierung dar, bei der die Alkohole zunächst in ihre Trimethylsilylether überführt werden müssen.^[56] Diese lassen sich bereits ab -78 °C in aprotischen Lösungsmitteln, mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) als Katalysator, mit Carbonylverbindungen in entsprechende Acetale umwandeln (Abbildung 7). Aufgrund von häufig auftretenden Umacetalisierungen entstehen bei dieser Methode jedoch vorzugsweise symmetrische OSK-Stäbe, was für die Darstellung asymmetrisch funktionalisierter OSK-Stäbe ein Problem darstellt. Dadurch ist auch die Verwendung von Edukten, die bereits Acetal-Strukturen enthalten, oft ungünstig. Die Doppelaktivierungsmethode löst dieses Problem, ist aber auf eine geringe Anzahl an Lösungsmitteln (Ether) beschränkt. Gängige beschriebene OSK-Bausteine lösen sich in Lösungsmitteln wie Diethylether (Et_2O) oder Methyl-*tert*-butylether (MTBE), die entstehenden OSK-Stäbe sind in der Regel unlöslich und werden dem Reaktionsgleichgewicht entzogen.^[52] Sowohl bei der NOYORI-Acetalisierung als auch der Doppelaktivierungsmethode können die Edukte ohne Überschuss eingesetzt werden. Bei der Doppelaktivierungsmethode wird mittels Natriumhydrid (NaH) zunächst die α -Position der Carbonylverbindung deprotoniert und über Trimethylsilylchlorid (TMSCl) ein Silylenolether (**IX**) erzeugt (Abbildung 8). Im Anschluss wird das Diol (**X**) mittels TMSOTf, unter Freisetzung von Trifluormethansulfonat (HOTf), silyliert. Der Silylenolether (**IX**) bildet durch Protonierung (H^+) in der α -Position ein Carbokation (**XI**), welches nucleophil vom Sauerstoff der Hydroxygruppe des Alkohols, unter Abspaltung von Trimethylsilanol (TMSOH), angegriffen wird (**XII**). Das Kation reagiert unter Ringschluss und Freisetzung von TMSOTf zum Ketal (**XIII**).

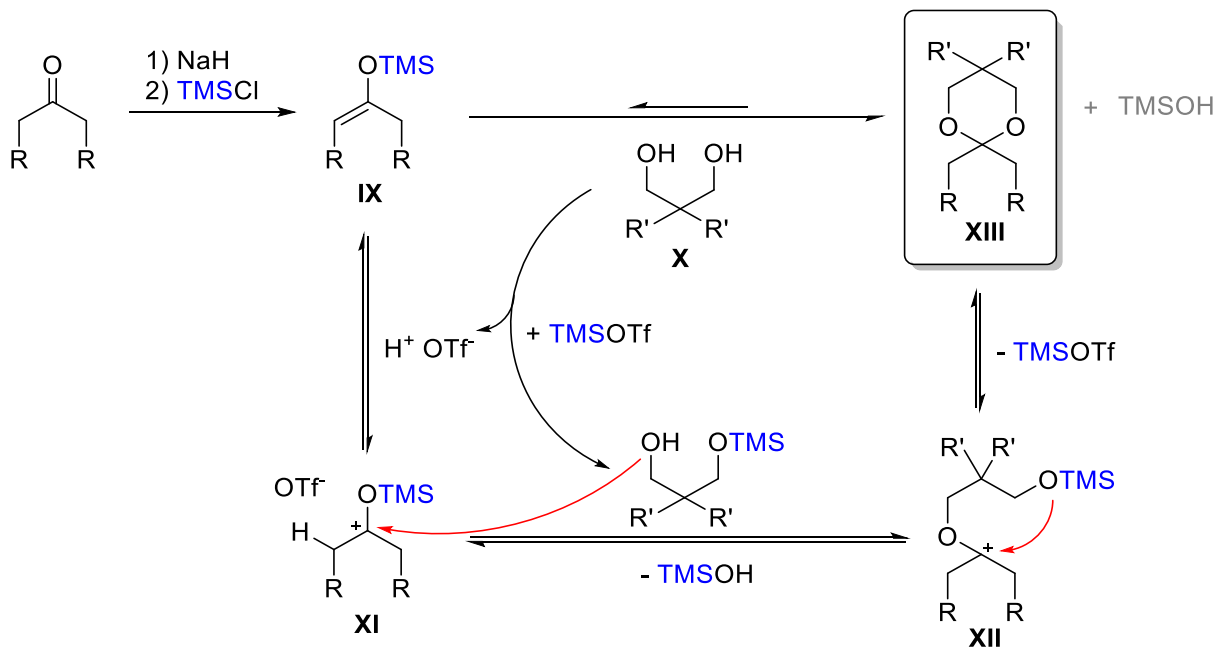


Abbildung 8. Mechanismus der Doppelaktivierungsmethode.

Welche der drei genannten Methoden am geeignetsten ist, variiert für jedes System individuell.

3.1.1.2 Gelenkstäbe

Im Zuge der Weiterentwicklung und Verlängerung der OSK-Stäbe wurden kürzlich OSK-Gelenkstäbe von WESSIG *et al.* beschrieben, in denen zwei starre OSK-Stäbe durch ein flexibles Gelenk miteinander verbunden sind.^[46] Je nach Umgebungsbedingungen liegen sie bevorzugt gestreckt (STR) oder geknickt (FOL) vor (Abbildung 9). Das hat den Vorteil, dass sich die Konformation des Stabes in biologischen oder biochemischen Anwendungen besser an seine Umgebung anpassen kann.

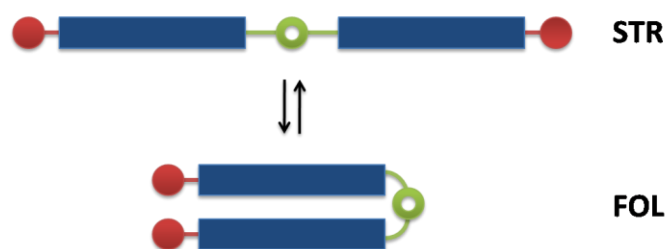


Abbildung 9. Allgemeine Struktur der Gelenkstäbe in gestreckter (STR) und geknickter (FOL) Form (blau = Stab, rot = terminale Funktionalitäten, grün = Gelenk).

Bisher wurden OSK-Gelenkstäbe mit 1,2,3-Triazolen (blau) als Gelenk-Einheit dargestellt (Abbildung 10). Ausgehend von Stäben, die endständig mit Azid (rot) und Alkin (grün) funktionalisiert sind, werden die 1,4-substituierten Triazole über die von SHARPLESS^[64] und MELDAL^[65] zeitgleich entwickelte, kupferkatalysierte (1,3-dipolare) Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) erhalten. Die CuAAC wird dem Konzept der Klick-Chemie zugeordnet^[66] und erzielt seit ihrer Entdeckung im Jahre 2001 ein stetig

wachsendes Interesse. Neben der organischen Synthese findet sie Anwendung in der Polymerchemie^[67], Dendrimersynthese^[68], Biochemie^[69] oder in den Materialwissenschaften^[70].

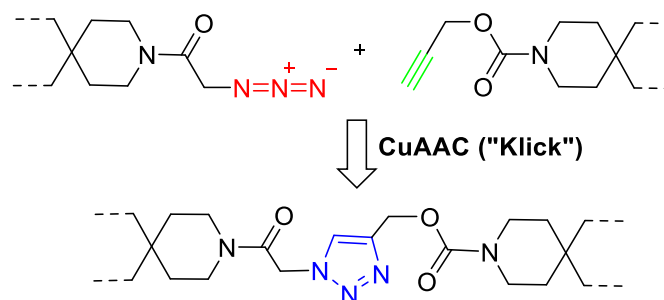


Abbildung 10. Synthese eines Triazol-Gelenks (blau) aus einem Azid (rot) und einem Alkin (grün).

Als Katalysatoren haben sich vor allem Cu(II)-Quellen bewährt. Die reaktive, aber unter sauerstoffhaltigen Bedingungen thermodynamisch instabile, Cu(I)-Spezies wird *in situ* erzeugt. Ein bekannter Vertreter ist CuSO₄/Natriumascorbat (2002 von SHARPLESS *et al.* publiziert^[62]), welcher Wasser als Lösungsmittel erlaubt. Der heterogene Cu/C-Katalysator ist ebenfalls ein sehr effizienter, billiger und langzeitstabiler Katalysator, der sich durch Filtration leicht abtrennen lässt und ohne weitere Additive auskommt. Aus einem Mix von Cu(NO₃)₂ und Aktivkohle in wässrigem Milieu entsteht der nanopartikelgroße Cu/C-Katalysator, der sowohl Cu(I)- (Cu₂O) als auch Cu(II)-Spezies (CuO) enthält.^[71] Die Cu(I)-Spezies wird in der Matrix ausreichend gut stabilisiert, um Reaktionen unter Sauerstoff durchzuführen.

Für die CuAAC wurden bisher zwei unterschiedliche Mechanismen postuliert, ein einkerniger (Pfad A) und ein zweikerniger (Pfad B, Abbildung 11) Mechanismus.^[72–74] Für den einkernigen Mechanismus gilt: Durch Ausbildung eines π -Komplexes (**XIV**) wird die Acidität des Alkins drastisch erhöht und die Bildung des Kupferacetylids (**XV**) begünstigt. Daraufhin lagert sich das α -Stickstoffatom regioselektiv an das Kupferzentrum (**XVI**) an, wodurch ein sechsgliedriger Übergangszustand (**XVII**) entsteht. Dieser lagert zur fünfgliedrigen Zwischenstufe (**XVIII**) um, welche nach Abspaltung des Kupferkomplexes das 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazol ergibt.^[64] Der zweikernige Mechanismus wurde aufgrund von kinetischen Messungen^[73] postuliert und wird durch viele experimentelle Resultate und theoretische Berechnungen gestützt, die zeigen, dass zwei Cu(I)-Ionen im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Bildung des ersten Zyklus) beteiligt sind.^[75]

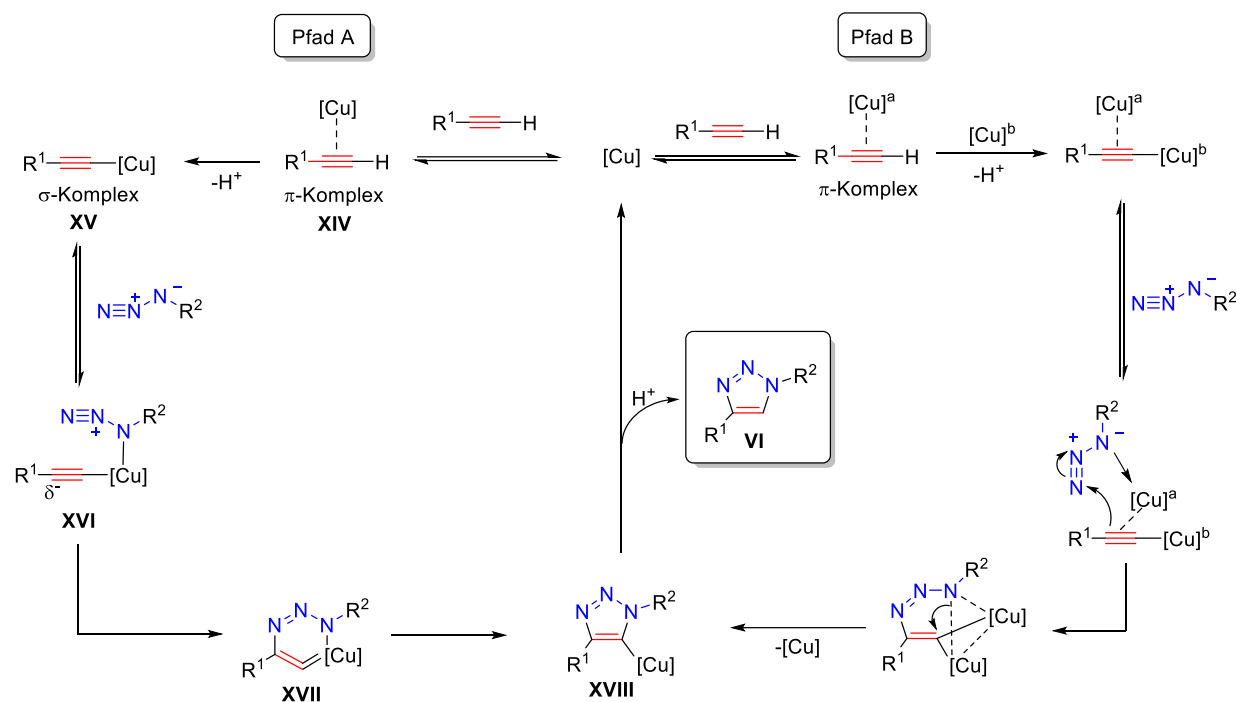


Abbildung 11. Einkerniger (Pfad A) und zweikerniger (Pfad B) CuAAC-Katalysezyklus.^[74]

3.1.2 Oligospirothioketale (OSTK)

Ein weiterer interessanter Abkömmling der OSK-Stäbe stellen Oligospirothioke^uthaketal (OSTK)-Stäbe dar, welche 2016 von WESSIG *et al.* beschrieben wurden.^[60] Im Gegensatz zu OSK-Stäben werden einige (XX) oder alle Ketale (XIX) durch Thioketale ersetzt, wie in Abbildung 12 schematisch dargestellt. Erste Spirane des Typs XIX wurden 1937 von BACKER *et al.* vorgestellt.^[76,77] Spirane des Typs XX wurden erstmals durch Wessig *et al.* beschrieben.^[60]

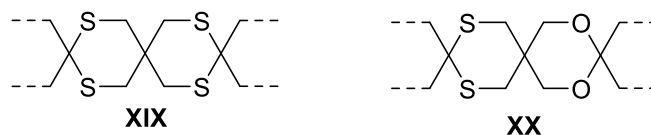


Abbildung 12. Struktur der OSTK-Stäbe.

OSTK-Stäbe bieten gegenüber OSK-Stäben einige Vorteile. Zum einen erfolgt der Aufbau von Acetalen säurekatalytisch im Gleichgewicht, weshalb OSK-Stäbe säurelabil sind. Dies ist bei OSTK-Stäben nicht der Fall. Auf dieser Grundlage können Ketale in Gegenwart von Thioketalen selektiv aufgebrochen werden (Abbildung 13).

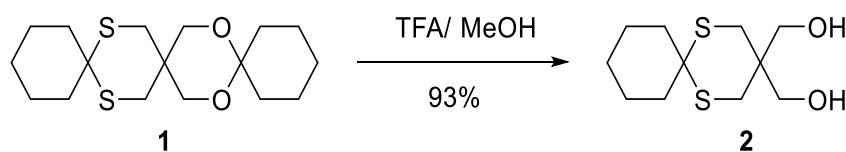


Abbildung 13. Synthese des Diols 2.^[60]

Zum anderen weisen OSTK-Stäbe eine höhere Rigidität auf, wodurch jedoch auch deren Löslichkeit deutlich herabgesetzt wird.^[78] Dieser Effekt lässt sich aufgrund der deutlich geringen Elektronegativität des Schwefels ($\chi = 2.58$), die der von Kohlenstoff ($\chi = 2.55$) sehr ähnelt, im Gegensatz zu Sauerstoff erklären ($\chi = 3.44$). Dadurch ist die C-S-Bindung im Vergleich zur sehr polaren C-O-Bindung tendenziell unpolar. Thioacetale zeichnen sich des Weiteren durch eine hohe Basenstabilität aus, jedoch reagieren sie sehr sensitiv auf einige Oxidationsmittel, was die einzelnen Synthesewege zum Aufbau von OSTK-Stäben einschränkt. Einer der bisher längsten synthetisierten OSTK-Stäbe ist in Abbildung 14 zu sehen. Um weiterhin in gängigen organischen Lösungsmitteln löslich zu sein, wurde hier die 2,5-disubstituierte Terephthalaldehyd (TAA)-Muffe mit löslichkeitsvermittelnden Pentyl-Gruppen eingebaut.^[60]

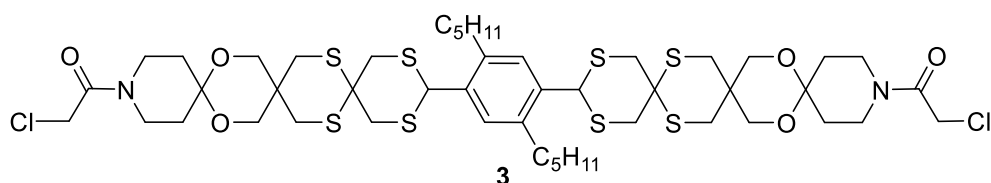


Abbildung 14. OSTK-Stab mit TAA-Muffe.^[60]

Durch die gleichzeitige Verwendung von Ketalen und Thioketalen in OSTK-Stäben lassen sich viele Probleme der OSK-Stäbe umgehen und einzigartige Stäbe für unterschiedlichste Anwendungen synthetisieren.

3.2 Fluoreszenz

Das Phänomen der Fluoreszenz tritt auf, wenn ein Molekül mit elektromagnetischer Strahlung in Wechselwirkung tritt und einen Teil der aufgenommenen Energie als Licht emittiert. Fluoreszenz ist bereits seit mehreren Jahrhunderten bekannt, geprägt wurde der Begriff 1852 durch G.G. STOKES.^[79] Sie wird vor allem bei ungesättigten Kohlenwasserstoffen, aber auch bei Quantenpunkten (QD) und Lanthanid-Komplexen beobachtet. Die genauen Prozesse werden im JABŁOŃSKI-Diagramm dargestellt (Abbildung 15).^[80] Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung, bei der die Resonanzbedingung ($h\nu = \Delta E = E(S_n) - E(S_0)$)³ erfüllt ist, kann ein Molekül aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in einen energetisch höheren Zustand S_n angeregt ($\approx 10^{-15}$ s) werden. Dabei handelt es sich um Ein-Elektronenübergänge zwischen Molekülorbitalen. In jedem der elektronischen Zustände S_0 , S_1 und S_n kann ein Molekül in unterschiedlichen Schwingungszuständen existieren. Durch verschiedene strahlungslose Desaktivierungsprozesse gibt das angeregte Molekül anschließend seine überschüssige Energie ab und relaxiert in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustands S_1 (10^{-9} s - 10^{-12} s). Man unterscheidet zwischen der inneren Konversion (*internal conversion*, IC) und inneren

³ h = PLANCK'sches Wirkungsquantum, ν = Frequenz der elektromagnetischen Strahlung, E = Energie

Relaxation (*internal relaxation*, IR). Bei der IC geht ein angeregtes Molekül aufgrund von Molekülschwingungen in einen niedrigeren elektronischen Zustand (S_n) derselben Spinmultiplizität über, woraufhin es durch Stoßprozesse in den niedrigsten Schwingungszustand des besetzten elektronischen Zustands relaxiert (IR). Der Übergang von S_1 zu S_0 kann durch unterschiedliche strahlungslose und strahlende Desaktivierungsprozesse wie IC/IR, Fluoreszenz, Spinumkehr (*intersystem crossing*, ISC)/IR oder Löschprozesse erfolgen. Als Fluoreszenz wird die Emission eines Photons aus dem S_1 -Zustand in den Grundzustand S_0 bezeichnet. Nach der Regel von KASHA^[81] erfolgt die Fluoreszenz aufgrund der schnellen Relaxation durch IC und IR üblicherweise aus dem schwingungsrelaxierten S_1 -Zustand und befindet sich typischerweise im unteren ns-Bereich. Kommt es zur Umkehr der Spinmultiplizität, so geht das angeregte Molekül strahlungslos in den schwingungsangeregten Tripletzustand T_1 über (10^{-8} s - 10^{-10} s). Da es sich um einen spinverbotenen Übergang handelt und bei Desaktivierung wieder eine Spinumkehr notwendig ist, verweilt das Molekül sehr viel länger in diesem Zustand, als es bei S_1 der Fall wäre. Aus dem schwingungsrelaxierten T_1 -Zustand kann das Molekül strahlungslos über ISC/IR oder strahlend durch Phosphoreszenz desaktivieren. Die einzelnen Desaktivierungsprozesse konkurrieren stets miteinander und werden vor allem von der Molekülumgebung beeinflusst. Strahlende Desaktivierungsprozesse wie Fluoreszenz und Phosphoreszenz werden unter dem Begriff der Lumineszenz zusammengefasst.^[80]

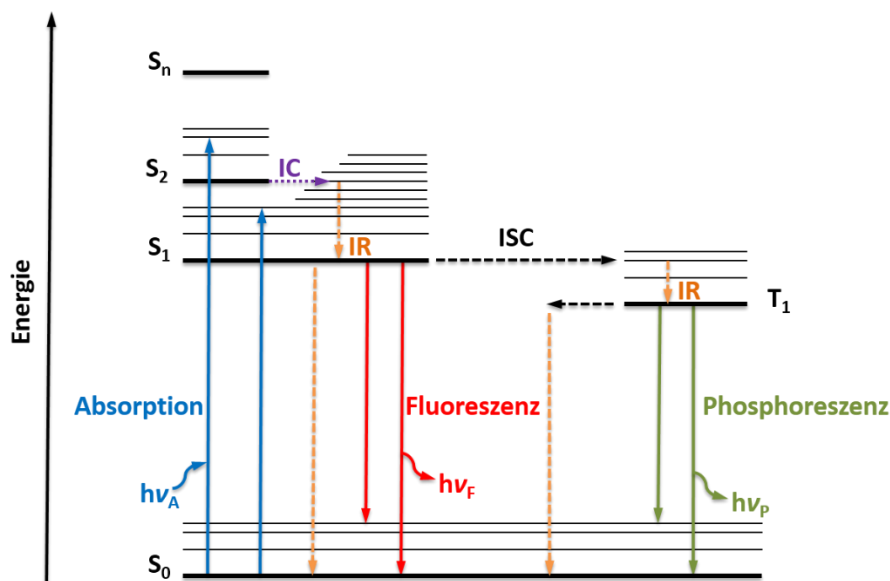


Abbildung 15. JABLONSKI-Diagramm.

Aufgrund des Energieverlustes durch IC/IR ist die beobachtete Fluoreszenz, im Vergleich zur Absorption, bathochrom bzw. zu höheren Wellenlängen verschoben (Abbildung 16). Der Abstand des langwelligsten Absorptionsmaximums (λ_{abs}) zum kurzwelligsten Emissionsmaximums (λ_{em}) wird als STOKES-Shift $\Delta\lambda$ bezeichnet und ist für jede Substanz charakteristisch. Ein sehr flexibles Molekül, dessen Geometrie sich zwischen Grund- und angeregtem Zustand ausreichend ändert, kann eine STOKES-

Verschiebung von > 10 nm erreichen. Der STOKES-Shift wird jedoch auch durch die Mikroumgebung des Fluorophors beeinflusst, wie Änderungen der Konformation, Ladungstransfer oder Lösungsmittelleffekte.^[80]

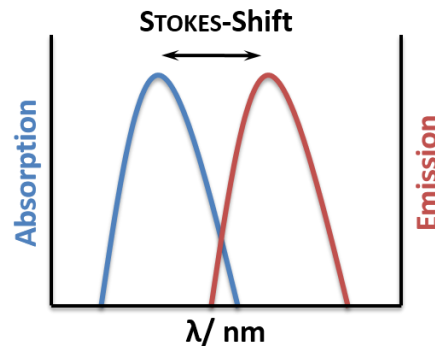


Abbildung 16. Darstellung des STOKES-Shift.

Aufgrund der individuellen spektroskopischen Eigenschaften von Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich verschiedene Fluorophore oft gut voneinander unterscheiden. Durch stationäre und zeitaufgelöste Messungen können die Änderungen ihrer spektroskopischen Eigenschaften detektiert werden.

3.2.1 Fluoreszenzlebensdauer und -quantenausbeute

Die Fluoreszenzlebensdauer (τ_F) und -quantenausbeute (ϕ_F) gehören zu den wichtigsten charakteristischen Größen von Fluoreszenzfarbstoffen und variieren oft durch Änderungen ihrer unmittelbaren Umgebung (pH-Wert, Polarität, Viskosität, Temperatur).

Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F gibt das Verhältnis von emittierten (N_{em}) zu absorbierten (N_{abs}) Photonen an (Gleichung 3.1), die Energie der Photonen bleibt dabei unbeachtet.

$$\phi_F = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad (3.1)$$

Über Gleichung 3.2 ist die ϕ_F über die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz k_F und der Geschwindigkeitskonstante für die strahlungslose Desaktivierung k_{nr} definiert. Letztere setzt sich aus allen strahlungslosen Desaktivierungsprozessen wie IC/IR oder ISC/IR zusammen. Aufgrund des Energieverlustes durch IC/IR gilt in den meisten Fällen $k_{nr} \neq 0$. Ist die strahlungslose Desaktivierungsrate sehr klein ($k_{nr} \ll k_F$), kann die ϕ_F Werte nahe 1 annehmen.

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} = k_F \tau_F \quad (3.2)$$

Besonders für biologische Anwendungen werden Fluorophore mit hohem ϕ_F benötigt, da sie bei geringem Energieeintrag ein intensives Fluoreszenzsignal erzeugen können. Schnell und effektiv kann

die ϕ_F mittels der ULBRICHT-Kugel bestimmt werden, für deren Nutzung kein Fluoreszenzstandard notwendig ist. Stattdessen wird der Fluorophor mit dem verwendeten Lösungsmittel ins Verhältnis gesetzt. Diese Methode wurde zur Bestimmung der ϕ_F in dieser Arbeit verwendet.

Die Fluoreszenzlebensdauer ist die mittlere Zeit, die ein Molekül nach Anregung im schwingungsrelaxierten S_1 -Zustand verweilt, um anschließend in den elektronischen Grundzustand S_0 überzugehen (Gleichung 3.3).

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{nr}} \quad (3.3)$$

Treten keine strahlungslosen Desaktivierungsprozesse auf, so ergibt sich die natürliche (intrinsische) Fluoreszenzlebensdauer τ_F^n :

$$\tau_F^n = \frac{1}{k_F} \quad (3.4)$$

Die ϕ_F kann aus der τ_F^n wie folgt definiert werden:

$$\phi_F = \frac{\tau_F}{\tau_F^n} \quad (3.5)$$

Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität I_F nach einem kurzen Laserpuls kann, bei unimolekularem Zerfallsmechanismus, durch das Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung beschrieben werden:

$$I_F = I_{F,0} \cdot e^{(-t/\tau)} = I_{F,0} \cdot e^{(k_i t)} \quad (3.6)$$

mit der Fluoreszenzintensität I_F , der Fluoreszenzintensität $I_{F,0}$ zum Zeitpunkt $t = 0$ min, der Zeit t , der Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustandes S_1 , der Geschwindigkeitskonstanten k_i (für den $S_1 \rightarrow S_0$ Übergang, $k_i = k_F + k_{nr}$). Dabei gilt, dass die Fluoreszenzintensität I_F zum Zeitpunkt t direkt proportional zur Anzahl, der zu diesem Zeitpunkt angeregten Moleküle, ist. Sind mehrere fluoreszierende Spezies vorhanden, so wird die Fluoreszenzintensität I_F über einen multiexponentiellen Ansatz beschrieben:

$$I_F = I_{F,0} \cdot \sum_n A_n \cdot e^{(-t_n/\tau)} \quad (3.7)$$

A_n und τ_n entsprechenden den Amplituden bzw. den Lebensdauern der jeweiligen fluoreszierenden Spezies. Experimentell wurde die τ_F in dieser Arbeit mittels der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (*time correlated single photon counting*, TCSPC) bestimmt. Diese Methode erzielt eine sehr gute Zeitauflösung (einige 10 ps) und eine hohe Detektionsempfindlichkeit (Nachweis einzelner Photonen). Durch kurze periodische (10^5 - 10^7 Zyklen) Lichtpulse wird das Molekül angeregt und die Zeit zwischen dem Anregungspuls und der Emission eines Photons gemessen. Je nach Fluorophor

wird typischerweise nach 10^{-10} s - 10^{-7} s ein Photon detektiert. Die Zeitdifferenz der einzelnen Zyklen wird in einem Histogramm als Count hinzugefügt (Abbildung 17). Dabei ist es wichtig, dass nur ein Photon pro Zyklus detektiert wird, um die Statistik nicht zu verfälschen ("pile up"). Daher wird die Messapparatur so eingestellt, dass nur alle 50 - 100 Zyklen ein Photon gemessen wird. Der Vorgang wird so oft wiederholt, bis sich ein statistisch aussagekräftiges Histogramm ergibt (z.B. ab 10000 Counts). Daraus ergibt sich ein exponentieller Abfall der Fluoreszenzintensität nach der Anregung.^[80]

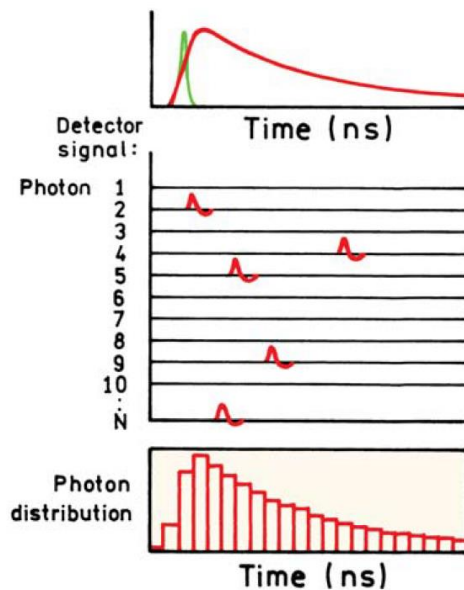


Abbildung 17. TCSPC-Prinzip (grün = Anregungspuls, rot = Counts). Die Abbildung wurde der Literatur entnommen.^[80]

3.2.2 Fluoreszenzlöschung

Unter Fluoreszenzlöschung bzw. -quenching werden alle Prozesse zusammengefasst, bei denen die Fluoreszenzintensität oder -lebensdauer eines Fluorophors verringert wird. Es wird zwischen der dynamischen und statischen Fluoreszenzlöschung unterschieden.

Statische Fluoreszenzlöschung

Bei der statischen Fluoreszenzlöschung bildet sich zwischen dem im Grundzustand befindlichen Fluorophor F und dem Löscher L ein nicht-fluoreszierender Grundzustandskomplex FL aus.



Es ergibt sich das Massenwirkungsgesetz, mit der Komplexbildungskonstante K_S :

$$K_S = \frac{[FL]}{[F][L]} \quad (3.9)$$

[L] entspricht der Konzentration des Löschers, [F] der Konzentration des Fluorophors und [FL] der Konzentration des nicht-fluoreszierenden Komplexes.

Die Gesamtkonzentration $[F]_0$ des Fluorophors ergibt sich aus:

$$[F]_0 = [F] + [FL] \quad (3.10)$$

Durch Einsetzen in Gleichung 3.9 erhält man:

$$K_S = \frac{[F]_0}{[F][L]} - \frac{1}{[L]} \quad (3.11)$$

Wird nach $\frac{[F]_0}{[F]}$ umgestellt, so ergibt sich Gleichung 3.12, die die STERN-VOLMER Gleichung für die statische Fluoreszenzlöschung darstellt. Die Fluoreszenzintensität I_F des Fluorophors ist direkt proportional zu seiner Konzentration [F].

$$\frac{[F]_0}{[F]} = \frac{I_0}{I} = 1 + K_S[L] \quad (3.12)$$

Je größer die Konzentration des Löschers [L], desto kleiner ist die Fluoreszenzintensität I_F . Da bei der statischen Fluoreszenzlöschung lediglich die Anzahl der anregbaren Fluorophore verringert wird, wird die Fluoreszenzlebensdauer des nicht-komplexierten Fluorophors nicht beeinflusst.

Dynamische Fluoreszenzlöschung

Bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung erfolgt, aufgrund diffusionskontrollierter Kollisionen, eine strahlungslose Energieübertragung des angeregten Fluorophors auf einen zweiten Fluorophor (den Löscher L). Der Fluorophor selbst geht strahlungslos in seinen Grundzustand zurück. Die Geschwindigkeitskonstante k_L beschreibt die Geschwindigkeit des bimolekularen Deaktivierungsprozesses und kann in Gleichung 3.3, sofern $[L] > [F]$ gilt, eingesetzt werden:

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{nr} + k_L[L]} \quad (3.13)$$

Daraus ergibt sich nach Termumformung die STERN-VOLMER Gleichung, die den Abfall der Fluoreszenzintensität I_F , als auch der Fluoreszenzlebensdauer τ_F des angeregten Fluorophors, beschreibt:

$$\frac{[F]_0}{[F]} = \frac{\tau_F^0}{\tau_F} = \frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_{SV}[L] \quad (3.14)$$

mit der STERN-VOLMER Konstanten K_{SV} . Je größer die Konzentration des Löscher [L], desto kleiner sind I_F bzw. τ_F .

3.2.3 Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können Abstände nicht-invasiv auf molekularer Ebene direkt über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bestimmt werden. Die strahlungslose Energieübertragung, verursacht durch weitreichende Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, zwischen Donor (D) und Akzeptor (A) wurde 1948 von T. FÖRSTER beschrieben.^[82] Damit ein FRET stattfinden kann, müssen einige Bedingungen erfüllt sein. Zum einen muss das Emissionsspektrum des Donors ($\lambda_{em,D}$) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors ($\lambda_{abs,A}$) überlappen (Abbildung 18 - A). Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ berechnet sich aus der normalisierten Donorfluoreszenz F_D und der Akzeptorabsorption (Skaliert auf den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten des Akzeptors ϵ_A) und ist über Gleichung 3.15 definiert.

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.15)$$

Für die Energieübertragung nach FÖRSTER wird angenommen, dass die Schwingungsrelaxation deutlich schneller abläuft als der Energietransfer, sodass dieser immer aus dem schwingungsrelaxierten S_1 -Zustand erfolgt (Abbildung 18 - B).

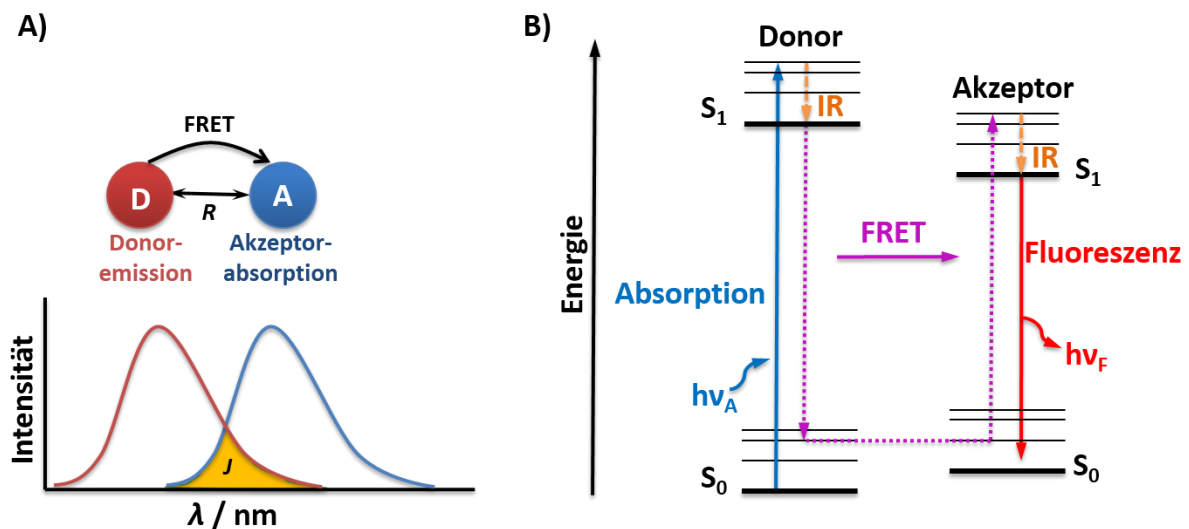


Abbildung 18. A: Überlapp J zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption, B: vereinfachtes Energieschema der Energieübertragung beim FRET.

Des Weiteren ist der Abstand R zwischen D und A entscheidend, dieser bewegt sich typischerweise zwischen 1 - 10 nm. Der ideale Abstand zwischen D und A wird als Försterradius (R_0) bezeichnet, an dessen Punkt die FRET-Effizienz E_{FRET} (Anteil absorbierter Photonen vom Akzeptor, die vom Donor übertragen wurden) 50% beträgt (Abbildung 19, Gleichung 3.16). Abstandsabhängige Messungen sind aufgrund der großen Änderung der FRET-Effizienz in diesem Bereich am aussagekräftigsten.

Geeignete FRET-Paare befinden sich allgemein im Bereich $0.5R_0 < R < 2R_0$.^[80] Der große Einfluss von R auf die FRET-Effizienz (E_{FRET}) wird vor allem aus Gleichung 3.16 ($E_{\text{FRET}} \sim R^{-6}$) und 3.17 deutlich. $k_T(R)$ ist die Energietransferrate vom D zum A, wobei $\tau_{\text{F,D}}$ die Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors entspricht.

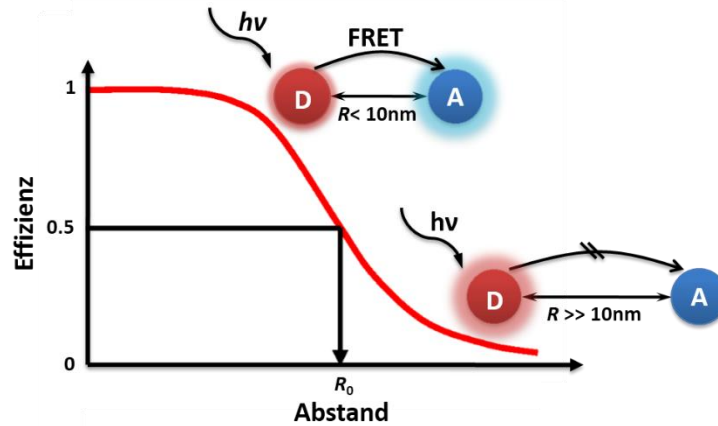


Abbildung 19. Darstellung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom D-A-Abstand.

R_0 ist Abhängig von den spektroskopischen Eigenschaften des D-A-Paares und kann über Gleichung 3.19, die sich aus Gleichung 3.17 und 3.18 ergibt, berechnet werden. Neben dem Brechungsindex des umgebenden Mediums (n_D) sind die Donorquantenausbeute ($\phi_{\text{F,D}}$), das Überlappintegral ($J(\lambda)$) und der Orientierungsfaktor (κ^2) Stellschrauben für den R_0 . N steht für die Avogadro-Konstante.

$$E_{\text{FRET,theor}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (3.16)$$

$$k_T(R) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (3.17)$$

$$k_T(R) = \frac{\kappa^2 \phi_D}{\tau_D R^6} \left(\frac{9000 (\ln 10) J(\lambda)}{128 \pi^5 N n_D^4} \right) \quad (3.18)$$

$$R_0 = \left(\frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 \phi_D J(\lambda)}{128 \pi^5 N n_D^4} \right)^{\frac{1}{6}} \text{ in } \text{\AA} \quad (3.19)$$

Eine hohe $\phi_{\text{F,D}}$ ist nicht zwingend erforderlich, sie erleichtert jedoch die Messung und erhöht die übertragbare Photonenmenge.^[83] Der Orientierungsfaktor κ^2 , der sich nach Gleichung 3.20 und 3.21 auf die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander bezieht, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. θ_T ist der Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment der Donoremission und dem Übergangsdipolmoment der Akzeptorabsorption und θ_D , θ_A beschreiben die Winkel dieser Dipole zur D-A Verbindungslinie (Abbildung 20).^[80]

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad (3.20)$$

$$\kappa^2 = (\sin\theta_D\sin\theta_A\cos\phi - 2\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad (3.21)$$

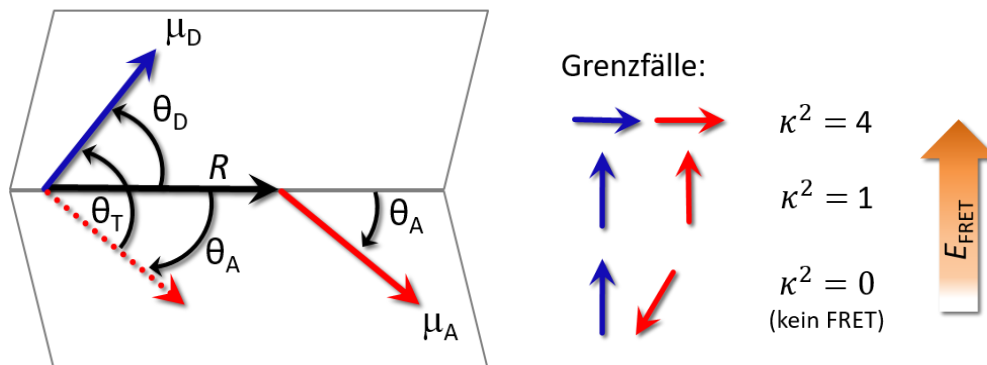


Abbildung 20. Abhängigkeit des Orientierungsfaktors κ^2 von der Richtung des Donor-Emissionsdipols und des Akzeptor-Absorptionsdipols.

Je nach Orientierung zueinander kann κ^2 Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Die FRET-Effizienz ist am Höchsten, wenn die Übergangsdipolmomente kollinear ($\theta_A = \theta_D = \theta_T = 0^\circ$, $\kappa^2 = 4$) zueinander stehen und sinkt, wenn der Winkel zwischen ihnen größer wird. Stehen sie parallel ($\theta_A = \theta_D = 90^\circ$, $\theta_T = 0^\circ$) zueinander, so ist $\kappa^2 = 1$. Bei orthogonaler Ausrichtung ($\theta_A = \theta_D = \theta_T = 90^\circ$) wird $\kappa^2 = 0$ und damit auch die FRET-Effizienz null. Für die meisten organischen FRET-Paare in Lösung wird ein κ^2 -Wert von $2/3$ (der über alle möglichen Winkel integrierte Mittelwert) angenommen. Dieser Wert setzt eine freie (isotrope) Drehbarkeit der Fluorophore im angeregten Zustand voraus.^[80,84–86] κ^2 kann außerdem durch seine Umgebung beeinflusst werden. Je nach Art des Abstandhalters und Aufbau des (Makro)Moleküls/ Fluorophors kann es zu Einschränkungen des verfügbaren Platzes durch intramolekulare Wechselwirkungen oder durch konformationelle Hindernisse und dadurch auch zu deutlichen Veränderungen von κ^2 führen. Die Fehlkalkulation von κ^2 kann bei der Berechnung von R_0 einen Fehler von bis zu 40% verursachen.^[86] Die Situation kann in Fällen, in denen der κ^2 -Wert und der D-A-Abstand nicht mehr unabhängig voneinander sind, noch komplexer werden.^[87] Durch die Verwendung von Fluorophoren, die rigide über einen molekularen Stab (R) miteinander verbunden sind, könnten abstandsabhängige Kraftmessungen leichter kontrollierbar sein. Nach diesem Prinzip können zwei Grenzfälle unterschieden werden, die in Abbildung 21 dargestellt sind. Im ersten Fall a) stehen die Übergangsdipolmomente (grüne Pfeile) von D und A kollinear zueinander, κ^2 erreicht dadurch das Maximum von 4. Wird der FRET-Stab durch einen äußeren Stimulus (blaue Pfeile) verbogen, so ändert sich die Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander, κ^2 wird kleiner und damit auch die FRET-Effizienz. Zur gleichen Zeit wird jedoch der Abstand zwischen D und A verringert, was wiederum die FRET-Effizienz erhöht. Theoretische Berechnungen zeigen jedoch, dass der Einfluss von κ^2 bei einer geringen Verbiegung größer ist.^[88] Im zweiten Fall b) stehen die Übergangsdipolmo-

mente orthogonal zueinander, κ^2 und die FRET-Effizienz betragen null. Durch Verbiegung nimmt der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten ab, κ^2 wird größer und ein FRET ist messbar. Zur Realisierung eines solchen Konzepts bedarf es Fluorophore, die sich rigid an einen molekularen Stab anbringen lassen und deren Übergangsdipolmomente im 0°- oder 90°-Winkel zur Stab-Achse stehen.

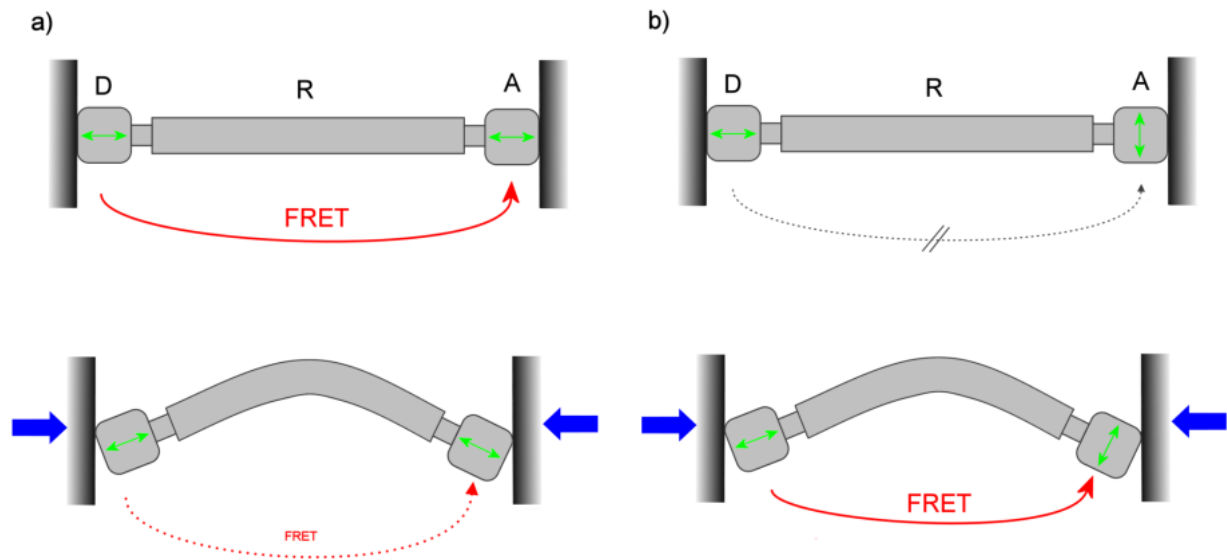


Abbildung 21. Prinzipien der kraftabhängigen FRET-Stäbe (D = Donor, A = Akzeptor, R = molekularer Stab (Abstandshalter), grüne Pfeile = Übergangsdipolmoment, blaue Pfeile = äußerer Stimulus). Die Abbildung wurde der Literatur entnommen.^[88]

Dass die rigide Verbindung der Fluorophore von entscheidender Bedeutung ist, zeigten LANGHALS *et al.*, die ein FRET-Paar aus Benzoperylen und Perylen über einen kurzen Abstandshalter so miteinander verknüpften, dass die Übergangsdipolmomente orthogonal zueinander stehen. Obwohl nach theoretischen Berechnungen kein FRET standen finden sollte, wurde eine fast 100%ige FRET-Effizienz beobachtet, die auf molekulare Schwingungen der Fluorophore zurückzuführen ist.^[89]

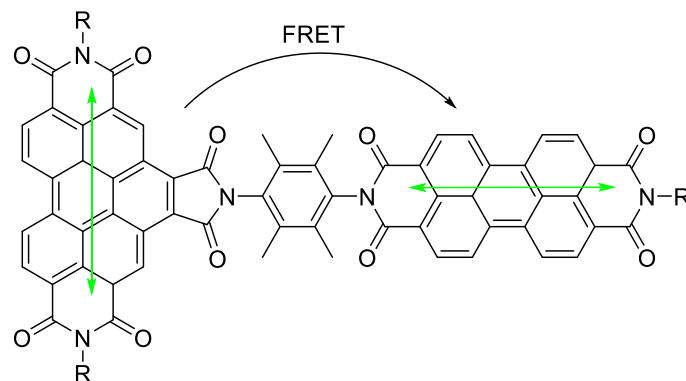


Abbildung 22. FRET-Paar mit orthogonalen Übergangsdipolmomenten (grüne Pfeile).^[90]

3.2.4 Fluoreszenzanisotropie

Auf der Grundlage das die Übergangsdipolmomente der Absorption μ_A und Emission μ_E zueinander orientiert sind, emittieren Fluorophore nach Anregung mit linear polarisiertem Licht, abhängig von ihrer räumlichen Ausrichtung, ebenfalls polarisiertes Licht. Die resultierende Emissionspolarisation wird durch die Fluoreszenzanisotropie r beschrieben. In Abbildung 23 ist der schematische Aufbau zur Messung der Fluoreszenzanisotropie dargestellt.

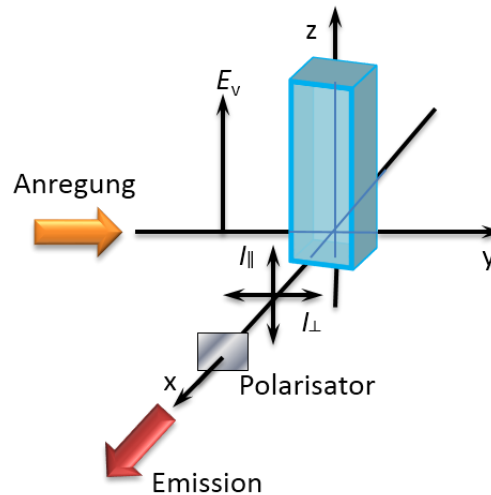


Abbildung 23. Schematischer Aufbau zur Messung der Fluoreszenzanisotropie im L-Format (E_v = elektrischer Feldvektor des eingestrahlt Lichtes, blauer Kasten: Kuvette).^[80]

Die Probe wird mit linear polarisiertem Licht angeregt. Der elektrische Feldvektor E_v ist dabei parallel zur z-Achse orientiert (vertikal polarisiertes Licht). Über einen Polarisator wird die Intensität der Fluoreszenzemission detektiert. Die Detektion erfolgt in vertikaler (I_{\perp}) als auch in horizontaler (I_{\parallel}) Richtung zur z-Achse und ist folgendermaßen definiert:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3.22)$$

Die Anregung kann auch mit horizontal polarisiertem Licht erfolgen. Die Anisotropie wird auf die Gesamtintensität ($I_{\text{total}} = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$) normiert und ist dadurch konzentrationsunabhängig (Ausnahme z.B. Streuung durch zu hohe Konzentrationen). Des Weiteren handelt es sich um eine dimensionslose Größe. Die Orientierung der Übergangsdipolmomente der Absorption μ_A und Emission μ_E bestimmen die Größe der Anisotropie r . Bedeutsam sind hierbei vor allem die Winkel β und θ . β beschreibt die Lage der Übergangsdipolmomente zueinander und θ beschreibt die Orientierung zwischen den Übergangsdipolmomenten und der Polarisationsrichtung des eingestrahlt Lichtes (hier z-Achse). In Abbildung 24 ist der Zusammenhang zwischen θ und r dargestellt. Die Anisotropie eines in z-Richtung orientierten Moleküls ($\theta = 0^\circ$) mit parallelen Übergangsdipolmomenten entspricht $r = 1$.^[80]

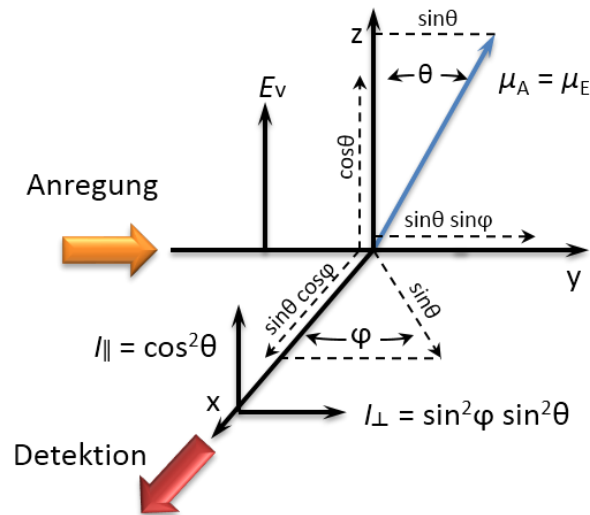


Abbildung 24. Fluoreszenzintensität in horizontaler und vertikaler Richtung eines Fluorophors in einem Koordinatensystem nach Einstrahlung vertikal polarisierten Lichts. Die Dipolmomente μ_A (blauer Pfeil) und μ_E stehen hier parallel zueinander.^[80]

Die Anregungswahrscheinlichkeit eines Fluorophors in Lösung mit vertikal polarisiertem Licht ist proportional zu $\cos^2\beta$. Ist der elektrische Feldvektor E_v des eingestrahnten Lichtes parallel zu μ_A ($\theta = 0^\circ$) ist die Wahrscheinlichkeit der Absorption am größten (Photoselektion). Unter der Annahme, dass eine Einphotonenanregung in isotroper Probenlösung stattfindet, ergibt sich für die photoselektive Verteilung der Fluorophore, die mit vertikal polarisiertem Licht angeregt werden können, folgende Gleichung:

$$f(\theta)d\theta = \cos^2\theta \sin d\theta \quad (3.23)$$

Die Anisotropie einer fluoreszierenden Probe ist in diesem Fall (parallele Übergangsdipolmomente $\theta_A = \theta_E$, symmetrische Verteilung der Fluorophore um z-Achse) auf den maximalen Wert von $r_{\max} = 0.4$ begrenzt. Finden keine dynamischen Depolarisierungsprozesse (z.B. Rotation, Energietransfer) statt, so spricht man von der fundamentalen Anisotropie r_0 . Sind die Übergangsdipolmomente nicht parallel zueinander orientiert $\theta_A \neq \theta_E$, so ergibt sich für die Fluoreszenzanisotropie r_0 folgende abhängig vom Winkel β (Winkel zwischen μ_A und μ_E):

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (3.24)$$

Der Faktor $\frac{2}{5}$ beschreibt dabei die Photoselektion. Die Anisotropie r_0 kann bei Abwesenheit von Molekülrotationen Werte zwischen $r_0 = -0.2$ ($\beta = 90^\circ$) und $r_0 = 0.4$ ($\beta = 0^\circ$) annehmen. Das Vorhandensein von diffusionsbedingten Molekülrotationen, die zur Drehung der Dipolachsen führen, verrin-

gert die Emissionspolarisation bzw. depolarisiert die Fluoreszenz. Unter Berücksichtigung der Fluoreszenzdepolarisation erhält man die PERRIN-Gleichung:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\Phi} \right) \quad (3.25)$$

mit der Fluoreszenzabklingzeit τ_F und der Rotationskorrelationszeit Φ . Letztere ist für sphärische Moleküle folgendermaßen definiert:

$$\Phi = \frac{\eta V}{R_G T} \quad (3.26)$$

Die Fluoreszenzdepolarisation ist demnach abhängig von der Viskosität η des Lösungsmittels, dem Volumen V des Fluorophors und der Temperatur T ($R_G =$ Gaskonstanten). Wenn die Rotationskorrelationszeit Φ gegen null geht, ist die Rotation der Fluorophore unendlich schnell.

Die experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie erfolgt oft auf der Grundlage des L-Formats (Abbildung 23). Die Emission wird nacheinander in vertikaler und horizontaler Richtung detektiert. Die detektierten Intensitäten müssen jedoch, aufgrund der polarisationsabhängigen Transmissionseffizienz des Emissionsmonochromators, korrigiert werden:

$$I_{vv} = k_P S_v I_{\parallel} \quad (3.27)$$

$$I_{vh} = k_P S_h I_{\perp} \quad (3.28)$$

Der erste Index v steht für eine vertikal polarisierte Anregung, der zweite Index weist auf die vertikale (v) bzw. horizontale (h) Detektionspolarisation hin. S_v und S_h beschreiben die unterschiedlichen polarisationsabhängigen Sensitivitäten des Emissionskanals in vertikaler bzw. horizontaler Polarisation und k_P einen Proportionalitätsfaktor. Durch dividieren der Gleichungen 3.27 und 3.28 erhält man den Gerätekorrekturfaktor G (Gleichung 3.29). G kann durch Anregung der Probe mit horizontal polarisiertem Licht (Index h) ermittelt werden (Gleichung 3.30).

$$\frac{I_{vv}}{I_{vh}} = \frac{S_v}{S_h} = G \quad (3.29)$$

$$\frac{I_{hv}}{I_{hh}} = \frac{S_v}{S_h} = G \quad (3.30)$$

Aus den polarisationsabhängigen Fluoreszenzintensitäten ergibt sich die Fluoreszenzanisotropie dann wie folgt:

$$r = \frac{I_{vv}(t) - I_{vh}(t)G}{I_{vv}(t) + 2I_{vh}(t)G} \quad (3.31)$$

Befindet sich der Fluorophor in einer anisotropen Molekülumgebung, wie z.B. eine Phospholipidmembran, so wird dessen Rotation räumlich eingeschränkt (gehinderte Rotation).^[90] Die resultierende unvollständige Depolarisation führt dazu, dass die Fluoreszenzanisotropie über die Zeit nicht auf null zurückgeht. Die Anisotropie, die nach langen Zeiten noch detektiert werden kann, wird als Grenzanisotropie r_∞ bezeichnet. Der Fluorophor kann nur in einem Kegelwinkel θ_c ($0^\circ \leq \theta_c \leq 90^\circ$) rotieren, wodurch der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ durch das "wobble-in-a-cone"-Modell (Abbildung 25) nach Gleichung 3.32 beschrieben werden kann.^[90,91]

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \exp\left(-\frac{t}{\phi}\right) + r_\infty \quad (3.32)$$

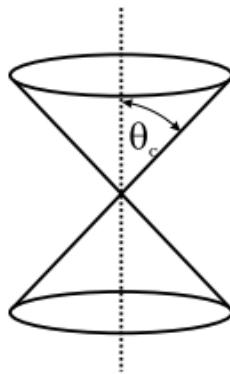


Abbildung 25. "Wobble-in-a-cone"-Modell zur Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie einer gehinderten Rotation.^[91]

Der Grad der Rotationshinderung lässt sich über A_∞ beschreiben und ist eine Funktion des halben Öffnungswinkels θ_c .^[91,92]

$$A_\infty = \frac{r_\infty}{r_0} = \left[\frac{1}{2} \cos\theta_c (1 + \cos\theta_c) \right]^2 \quad (3.33)$$

Bei einer stark eingeschränkten Rotation nähert sich A_∞ 1 an, wobei θ_c sehr klein ($\theta_c \rightarrow 0^\circ$) ist. Ist die Rotation jedoch ungehindert ($\theta_c \rightarrow 90^\circ$), so geht A_∞ gegen null. Im letzten Fall erhält man für die zeitaufgelöste Anisotropie $r(t)$ einen monoexponentiellen Verlauf.

3.3 Moderne Methoden der Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein etabliertes Forschungsinstrument, welches, aufgrund der wachsenden Verfügbarkeit spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe, der nicht-invasiven Anwendung und hohen Sensitivität, bereits für vielfältige diagnostische Untersuchungen in lebendenden Zellen verwendet wird. Die Bilderzeugung erfolgt durch stationäre bzw. zeitaufgelöste Detektion der Fluoreszenzintensität.

Konfokale Laserrastermikroskopie

Bei der konfokalen Laserrastermikroskopie erfolgt die Bilderzeugung punktuell, durch sequenzielles Abrastern der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl. Bei einem konventionellen Lichtmikroskop werden hingegen alle Objektpunkte parallel abgebildet. Der schematische Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 26 dargestellt. Ein Laserstrahl (blau) wird über einen dichroitischen Spiegel in Richtung der Probe gelenkt. Dieser dichroitische Spiegel lässt definierte Wellenlängen passieren bzw. reflektieren, sodass Anregungs- und Emissionslicht voneinander separiert werden können. Mithilfe eines Objektivs wird der Laserstrahl auf die Probe fokussiert. Die daraufhin emittierte Fluoreszenz (grün) erreicht ebenfalls das Objektiv und wird über den dichroitischen Spiegel vom Anregungsstrahl (blau), unter Ausnutzung der STOKES-Verschiebung, getrennt. Über einen Emissionsfilter passiert lediglich Strahlung im gewünschten Wellenlängenbereich den Detektor. Die Lochblende verhindert, dass Fluoreszenzemission die außerhalb der Fokalebene entsteht, den Detektor erreicht und minimiert den Anteil des Streulichts, wodurch der Kontrast erhöht wird. Der Piezoscanner ermöglicht die Punkt-für-Punkt Abrasterung der Probe in x- und y-Richtung.^[92,93]

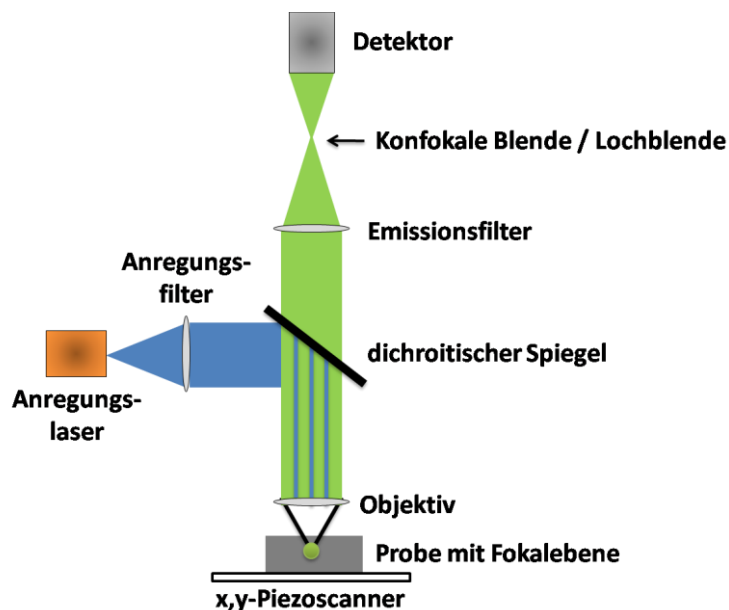


Abbildung 26. Schematischer Strahlengang eines Fluoreszenzmikroskops.

Die konfokale Laserrastermikroskopie ist beugungsbegrenzt und erreicht eine maximale laterale bzw. axiale Auflösung von $d_{xy} = 0.14 \mu\text{m}$ bzw. $d_z = 0.57 \mu\text{m}$.^[94] Die maximale Auflösung d ist über die ABBE-Gleichung wie folgt definiert:

$$d_{xy} = \frac{\lambda_{em}}{2NA} \quad (3.34)$$

$$d_z = \frac{n_D \cdot \lambda_{em}}{NA^2} \quad (3.35)$$

mit dem Brechungsindex n_D und der numerischen Apertur NA des Objektivs.^[93]

Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie (FLIM)

Die Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy*, FLIM) ist ein viel genutztes Bildgebungsverfahren, das einige Probleme fluoreszenzintensitäts-basierter Mikroskopie löst. Da die Fluoreszenzabklingzeit unabhängig von der Konzentration des Fluorophors ist, stellen Farbstoff-Extrusion oder Photobleichen keine Störfaktoren dar. Im Gegensatz zur Laserrastermikroskopie wird hier die entsprechende Fluoreszenzabklingzeit punktwise aufgenommen. Das zweidimensionale FLIM-Bild gibt die detektierten Fluoreszenzabklingzeiten in einer Falschfarbenskala wieder, wobei kurze Abklingzeiten blau und lange Abklingzeiten rot dargestellt werden. Dadurch lassen sich umgebungsspezifische Abhängigkeiten eines oder mehrerer Fluorophore im Zellgewebe untersuchen. Nachteil dieser Methode ist die verhältnismäßig langsame Aufnahmezeit, die, abhängig von der Bildgröße, zwischen einigen Sekunden bis Minuten betragen kann.

Eine weitere interessante Mikroskopietechnik stellt die Zweiphotonenabsorptions-Mikroskopie dar. Das Prinzip wird im folgenden Abschnitt erklärt.

3.4 Zweiphotonenabsorption

Um biologisches Gewebe spektroskopisch besonders schonend zu untersuchen, bieten sich vor allem hohe Anregungswellenlängen (λ_{exc}) an. Durch Zweiphotonenabsorption (2PA) können sehr langwellige und damit energieärmere λ_{exc} erreicht werden. Im Gegensatz zur Einphotonenabsorption (1PA) werden bei der 2PA nahezu zeitgleich ($\approx 10^{-18}$ s) 2 Photonen (2P) durch ein und dasselbe Molekül absorbiert (Abbildung 27).^[95] M. GÖPPERT-MAYER publizierte im Jahre 1931 die ersten quantenmechanischen Berechnungen die zur Entdeckung der 2PA führten.^[96] Erst 1961 konnten KAISER *et al.*, kurz nach der Erfindung des Lasers, dieses Phänomen experimentell nachweisen.^[97] Aufschwung bekam die 2PA jedoch erst in den 1990er Jahren, durch die Entwicklung von Subpikosekundenlaser (vor allem der Titan:Saphir-Laser) und aufgrund der Entwicklung der 2P-Fluoreszenzmikroskopie durch DENK *et al.*^[98] Neben der 2PA können auch drei und mehr Photonen gleichzeitig absorbiert werden. In diesem Fall spricht man allgemein von der Mehrphotonenabsorption (MPA). In Abbildung 27 ist ein vereinfachtes Schema zur Darstellung der MPA gezeigt. Bei der simultanen Anregung eines Moleküls durch mehrere Photonen muss die Summe ihrer Einzelenergien, der zur Anregung notwendigen Energie ΔE entsprechen. Anstatt ein Molekül mit einer Wellenlänge von z.B. $\lambda_{exc} = 360$ nm (1P) vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen elektronisch angeregten Zustand S_n anzuregen, wird es bei der 2PA mit Licht doppelter Wellenlänge (hier $\lambda_{exc,2P} = 720$ nm), durch zeitgleiche Absorption zweier Photonen, angeregt. Die λ_{em} ist daher bei der 2PA kleiner als die $\lambda_{exc,2P}$.

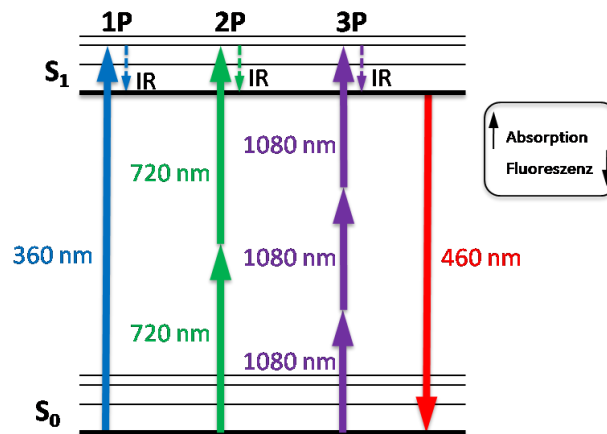


Abbildung 27. Vereinfachtes JABŁOŃSKI-Diagramm für die Ein- (blau, $\lambda_{exc} = 360$ nm), Zwei- (grün, $\lambda_{exc,2P} = 720$ nm) und Drei-Photonenabsorption (lila, $\lambda_{exc,3P} = 1080$ nm) und Fluoreszenz ($\lambda_{em} = 460$ nm).

Bei der 2PA handelt es sich im Gegensatz zur 1PA um einen nichtlinearen optischen Prozess, bei dem die Zahl der absorbierten Photonen n mit dem Quadrat der Lichtintensität zunimmt:

$$n_{1P} \propto I_e \quad (3.36)$$

$$n_{2P} \propto I_e^2 \quad (3.37)$$

Die 2PA ist daher unter 1P-Anregungsbedingungen (UV-Laser) sehr unwahrscheinlich und benötigt besonders hohe Photonendichten (10^{20} - 10^{30} Photonen/cm² s) um ein messbares Signal zu erhalten.^[90] Durch die Verwendung von fokussierten Pulslasern werden sehr hohe Lichtintensitäten erzeugt und die MPA wird zugänglich. Ein Puls laser erzeugt ultra-kurze Lichtimpulse mit Halbwertsbreiten um 100 fs und Wiederholungsraten um 100 MHz (entspricht 1 Puls alle 10 ns). Da die einzelnen Pulse um 5- bis 6-Mal kürzer sind, als die dazwischen liegenden Ruhephasen ist die mittlere Leistung allerdings gering. Des Weiteren wird die nötige Lichtintensität für die 2PA erst im Fokuspunkt des Laserstrahls erhalten.^[99] In Abbildung 28 werden zwei Laserstrahlen in Fluorescein enthaltende Küvetten fokussiert. Bild A zeigt 1PA bei der die Wellenlänge, der Anregungswellenlänge des Fluoresceins entspricht (UV-Laser). Der rechte Strahl (NIR-Laser) in Bild B hat annähernd die doppelte Wellenlänge und kann daher nur durch 2PA die Fluoresceinmoleküle zur Fluoreszenz anregen. Bei der 1PA findet entlang der gesamten Strahlenachse Absorption bzw. Fluoreszenz statt. Bei der 2PA wird hingegen nur aus dem Brennpunkt Fluoreszenz emittiert. Dieser Effekt kann in der 2PA-Mikroskopie zur besonders schonenden Bilderzeugung genutzt werden, da Ausbleichen des Farbstoffs und die Schädigung des Gewebes (Phototoxizität) außerhalb des Fokuspunktes erheblich minimiert werden.

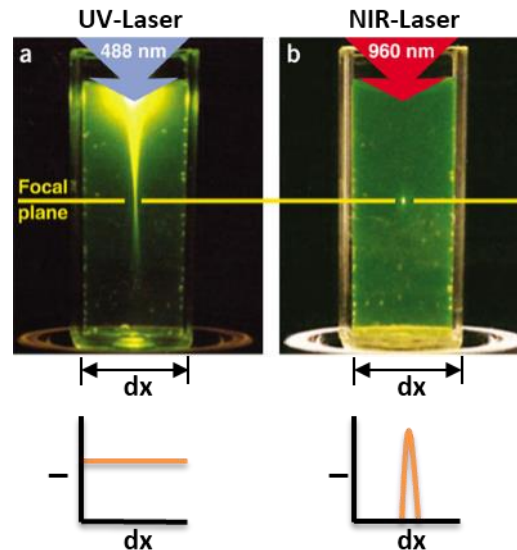


Abbildung 28. Anregung von Fluorescein a: 1PA $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, b: 2PA $\lambda_{\text{exc},2\text{P}} = 960 \text{ nm}$. Die Abbildung wurde der Literatur entnommen.^[100] Die Graphen zeigen die Intensitätsverteilung in der Küvette.

Über den 2P-Absorptionsquerschnitt σ_2 wird die Wahrscheinlichkeit eines 2P-Übergangs beschrieben. σ_2 ist Abhängig vom Fluorophor und der Anregungswellenlänge und wird nach seiner Entdeckung in GÖPPERT MAYER (1 GM = $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s/ Photonen}$) angegeben. Da die direkte Bestimmung des σ_2 schwierig und aufwendig ist, wird der σ_2 gängigerweise über eine Relativmethode, durch Vergleich mit einem bekannten Standard (z.B. Fluorescein), bestimmt. Aus den Fluoreszenzsignalen wird zunächst der 2P-Emissionsquerschnitt $\sigma_{2\text{PE}}$ (in GM) berechnet, der proportional zum σ_2 (in GM) ist. Über die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F lässt sich σ_2 nach Gleichung 3.38 bestimmen.^[100]

$$\sigma_2 = \frac{\sigma_{2\text{PE}}}{\phi_F} \quad (3.38)$$

Die 2P-Mikroskopie erreicht eine maximale laterale bzw. axiale Auflösung von $d_{xy} = 0.23 \text{ }\mu\text{m}$ bzw. $d_z = 0.93 \text{ }\mu\text{m}$. Die im Vergleich zur konfokalen 1P-Laserrastermikroskopie (UV-Strahlung) schlechtere Auflösung beruht auf der stärkeren Beugung der NIR-Strahlung.^[96] Dahingegen werden höhere Gewebe-Eindringtiefen ermöglicht, da NIR-Strahlung weniger gestreut wird (RAYLEIGH-Streuung: $\sigma = f^4$). 2P-Farbstoffe werden neben der Mikroskopie^[98-101] auch für dreidimensionale Datenspeicher^[102,103], zur Mikrofabrikation^[104], zur lokalisierten Freisetzung biologisch aktiver Spezies^[105] oder zur optischen Leistungsbegrenzung^[106] verwendet.

⁴ σ = Streuquerschnitt der RAYLEIGH-Streuung, f = Frequenz der elektromagnetischen Welle

3.5 Sensorfluorophore

Wenn sich die spektralen Eigenschaften eines Fluorophors aufgrund einer Änderung der Fluorophor-umgebung ändern, spricht man von Sensorfluorophoren. Dies kann z.B. auf Löschprozesse oder auf strukturelle Veränderungen zurückgeführt werden.^[107,107,108] Diese Änderungen können am einfachsten über die Fluoreszenzintensität und -abklingzeit detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität ist jedoch abhängig von der Farbstoffkonzentration, was die Detektion in komplexen Systemen erschwert, da es aufgrund von Photobleichen und Farbstoff-Extrusion zu undefinierbaren Konzentrationsänderungen kommt.^[109] Durch die Verwendung ratiometrischer Fluorophore kann dieses Problem umgangen werden. Bindet ein ratiometrischer Fluorophor z.B. einen Analyten, so ändert sich nicht nur seine Fluoreszenzintensität, es kommt auch zur Verschiebung seiner Anregungs- oder Fluoreszenzwellenlänge. Die genannten Probleme können jedoch auch über die Detektion der weitestgehend konzentrationsunabhängigen Fluoreszenzabklingzeit umgangen werden und eine leichtere Quantifizierung der Analyten ermöglichen. Die Detektionsempfindlichkeit wird des Weiteren auch durch Hintergrundsignale fluoreszierender Zellkompartimente (Autofluoreszenz), sogenannte intrinsische Fluorophore, beeinträchtigt. Dazu zählen z.B. Flavine, NADH⁵, Chlorophyll, aromatische Aminosäuren oder genetisch codierte Fluoreszenzproteine (FPs), wie das Grün Fluoreszierende Protein (GFP), für dessen Entdeckung und Anwendung R. TSIEN, O. SHIMOMURA und M. CHALFIE 2008 den Nobelpreis erhalten haben.^[110] Es können jedoch auch ungebundene oder unspezifisch gebundene Fluorophore das Signal stören. Die Detektion der Autofluoreszenz kann entweder durch die Erhöhung der Anregungswellenlänge (> 500 nm) oder durch Auswahl geeigneter Filter minimiert werden.^[111] Durch die Wahl einer höheren Anregungswellenlänge wird außerdem die Lichtstreuung durch dichte Medien (z.B. Gewebe) reduziert, wodurch höhere Eindringtiefen erreicht werden (RAYLEIGH-Streuung: $\sigma = f^4$).^[112] Von besonderer Bedeutung ist die Detektion von Alkali- und Erdalkalimetallen, die in allen lebenden Systemen vorkommen. Im Folgenden wird ausschließlich auf die Detektion von Calcium-Ionen (Ca²⁺) eingegangen.

Calcium

Calcium (Ca²⁺) ist ein allgegenwärtiger intrazellulärer Botenstoff, der an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt ist. Nahezu alles im menschlichen Körper wird durch Calcium beeinflusst. Zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Sekretion von Neurotransmittern in Synapsen, Lern- und Erinnerungsprozesse^[113] werden durch Ca²⁺ gesteuert. In Muskelzellen werden Kontraktionsprozesse über die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern oder durch Einstrom aus dem extrazellulären Raum kontrolliert. Der Ca²⁺-Transport wird dabei über verschiede-

⁵ NADH = Nicotinamidadenindinukleotid

ne Neurotransmitter und Hormone aktiviert.^[114] Im Gegensatz dazu steuert Ca^{2+} auch die Expression von Proteinen, die den Zelltod auslösen (Apoptose und Nekrose).^[115] Daher ist es nicht nur aus wissenschaftlicher, sondern auch aus medizinischer Sicht wichtig, die intrazellulären Calciumkonzentrationen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeitlich und räumlich durch hochaufgelöste Untersuchungen darzustellen.

Damit der universelle, sekundäre Botenstoff Ca^{2+} derart viele zelluläre Prozesse beeinflussen kann, herrschen in den einzelnen Zellkompartimenten enorme Konzentrationsunterschiede. Während im ruhenden Zustand eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von ~ 100 nM vorherrscht, kann diese nach Ca^{2+} -Einstrom auf bis zu 1 - 2 μM ansteigen. Denn 99.9% des intrazellulären Ca^{2+} ist in Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) von Muskelzellen oder den Mitochondrien gespeichert (nM - mM).^[115] Aber auch im extrazellulären Raum herrscht eine große Ca^{2+} -Konzentration (~ 2 mM) wodurch ein hoher Gradient entsteht, der durch eine Vielzahl an Calciumpumpen und Calcium-bindenden Proteinen kontrolliert wird.^[116] Bis heute sind die meisten Ca^{2+} -abhängigen Wirkmechanismen nicht vollständig verstanden. Um freie Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol zu quantifizieren haben sich fluoreszierende Ca^{2+} -Sensoren etabliert. Den Anfang machte R. TSIEN 1980 als er den ersten synthetisierten UV-aktiven Ca^{2+} -Sensor entwickelte.^[117] Analog zum Ca^{2+} -Chelator EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) entwickelte er den 8-fach koordinierenden BAPTA-Liganden (Abbildung 29).

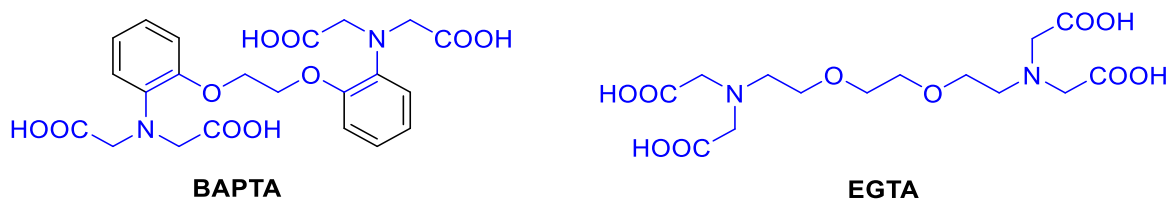


Abbildung 29. Strukturen von BAPTA und EGTA.

Die Besonderheit der Ionenspezifischen Untereinheit (blau, Abbildung 29) liegt in der hohen Selektivität zu Ca^{2+} (etwa 10^5 höher) gegenüber Mg^{2+} , da die Bindungstasche das kleinere Mg^{2+} nicht ausreichend stabilisiert. BAPTA koordiniert das divalente Ca^{2+} über vier Carboxylate, zwei Amine und Ether, in nahezu identischer sterischer Anordnung zu EGTA (Abbildung 30).

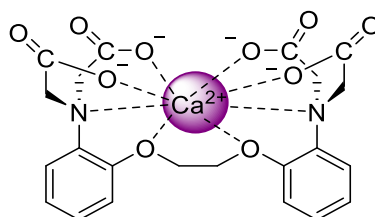


Abbildung 30. Komplexierung des divalenten Ca^{2+} durch BAPTA.

Kombiniert mit Fluoreszenzfarbstoffen, erhält man ein fluoreszierendes Rückgrat, welches individuelle spektrale Informationen über die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration liefert und vielfach variabel ist. Einer der ersten und bekanntesten Ca^{2+} -Sensoren ist der ratiometrische Ca^{2+} -Sensor Fura-2, welcher 1985 von R. TSIEN *et al.* entwickelt wurde (Abbildung 31).^[109]

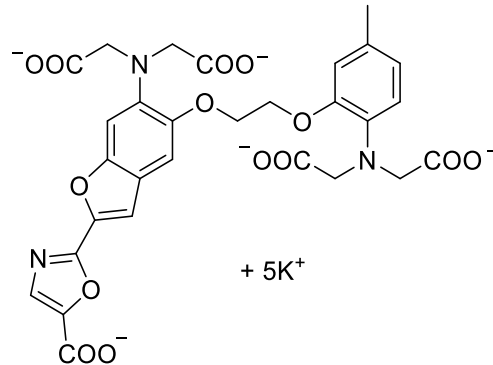


Abbildung 31. Ca^{2+} -Sensor Fura-2.

Neben den chemischen Ca^{2+} -Sensoren (extrinsische Fluorophore) werden auch genetisch kodierbare Ca^{2+} -Sensoren (intrinsische Fluorophore) eingesetzt. Wie das Protein Aequorin aus der Qualle *A. VICTORIA*, welches nach Ca^{2+} -Bindung luminesziert und dazu dient, spezielle Zellkompartimente gezielt zu markieren.^[118] Chemisch generierte Sensoren lassen sich jedoch individuell konzipieren und sind oft leichter zu handhaben. Die Änderung des spektroskopischen Signals chemischer Sensoren beruht auf einem photoinduzierten Elektronentransfer (PET). In Abbildung 32 ist der PET schematisch dargestellt. Bei der Anregung des Fluorophors wird ein Elektron aus dessen höchstem besetzten Molekülorbital (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) übertragen. Im Falle von BAPTA-Derivaten wird bei Abwesenheit des Kations (E^+) die Fluoreszenz des Fluorophors durch die freien Elektronenpaare der Stickstoffatome des BAPTA-Liganden gelöscht. Dabei wird ein Elektron aus dem HOMO des freien Rezeptors auf das einfach besetzte HOMO des angeregten (*) Fluorophors übertragen (Schema A). Wird das Kation vom Rezeptor gebunden, verschiebt sich die Elektronendichte der Stickstoffatome und senkt das HOMO des Rezeptors energetisch ab. Eine Ladungsübertragung ist nicht mehr möglich. Es kommt zur Deaktivierung des angeregten Fluorophors, in dem ein Elektron aus dessen LUMO in das HOMO übertragen wird und die Energie $h\nu_F$ über Emission eines Photons frei wird (Schema B).^[80,119,120] Die spektroskopischen Eigenschaften (z.B. I_F , τ_F , ϕ_F) beider Zustände (mit und ohne Kation) unterscheiden sich folglich voneinander.

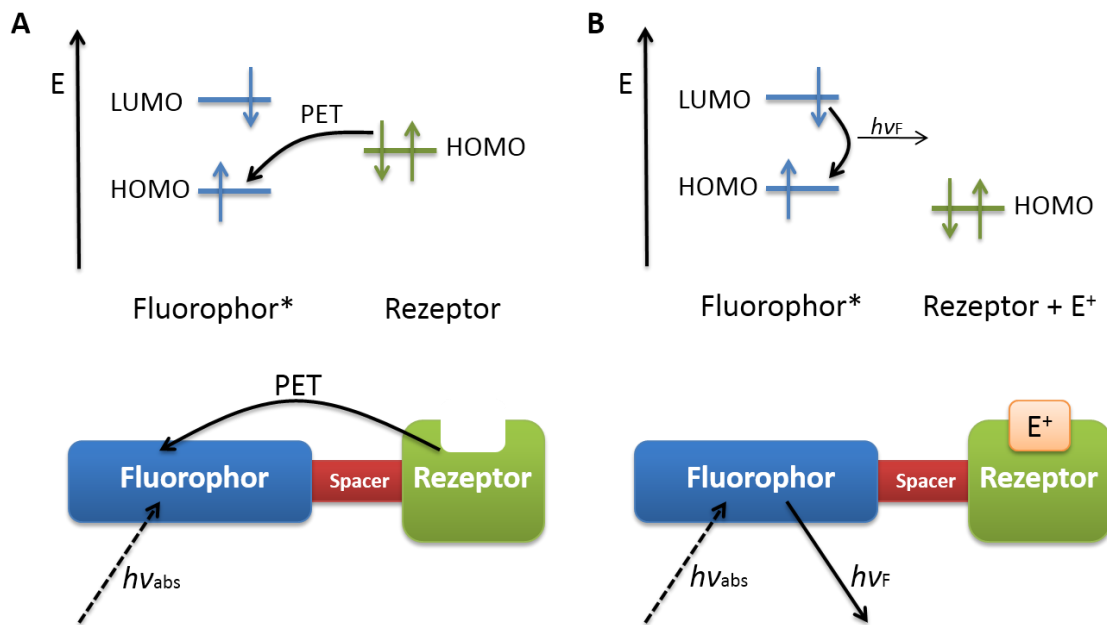


Abbildung 32. Schematische Darstellung des photoinduzierten Elektronentransfers (PET), A: in Abwesenheit des Kations und B: in Anwesenheit des Kations.

Mittlerweile sind eine Vielzahl an Ca^{2+} -sensitiven Fluorophoren bekannt und kommerziell erhältlich. Diese bestehen u.a. aus Fluoreszein-, Rhodamin-, Coumarin- oder BODIPY-Derivaten.^[112,121,122] Da zelluläre Prozesse jedoch sehr komplex sind, trägt die gleichzeitige Detektion eines Analyten mit anderen Biomolekülen, O_2 oder Ionen (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^-) zum viel besseren Verständnis bei und ist essentiell für die wachsenden Ansprüche der Molekularbiologie, medizinischen Diagnostik sowie der Wirkstoffforschung. Die zeitliche Detektion mehrerer Parameter wird als Multiplexing bezeichnet. Da die Fluoreszenzspektroskopie eine sehr sensitive Messmethode darstellt, ist diese besonders gut für Multiplexing-Experimente geeignet. Dabei können zwei oder mehr Sensorfluorophore zur gleichzeitigen Detektion genutzt werden. Diese müssen sich jedoch in ihren spektroskopischen Eigenschaften (λ_{abs} , λ_{em} , τ_{F} , r) ausreichend voneinander unterscheiden.^[123–125]

3.5.1 Speicheldrüsen

Einige der dargestellten Fluorophore sollten in einem biologischen System untersucht werden. Für entsprechende zellphysiologische Messungen wurden die Speicheldrüsen der Amerikanischen Schabe *PERIPLANETA AMERICANA* verwendet. Sie wurden bereits vielfach zur Charakterisierung von Stimulus-Sekretionskopplungen verwendet und dienen daher als gut etabliertes Modellsystem zur Analyse (elektro- und optophysilogisch) von Transport- und Regulationsmechanismen in Epithelien.^[33,126–128] Des Weiteren sind die Speicheldrüsen der *P. AMERICANA* aufgrund ihrer Größe leicht präparierbar. Sie lassen sich grob in zwei Regionen unterteilen: die traubenförmige Acini und daran anschließend ein verzweigtes Ausführungssystem (siehe Abbildung 33). In den Acini bildet sich

ein NaCl-reicher Primärspeichel, dieser wird durch Na⁺-Resorption und K⁺-Sekretion in den Ausführungsgängen modifiziert und anschließend weitergeleitet.^[129] Durch Stimulation mit den Neurotransmittern Dopamin und Serotonin kann eine Speichelbildung induziert werden und die Ausschüttung von Analyten mit entsprechenden Sensoren detektiert werden.

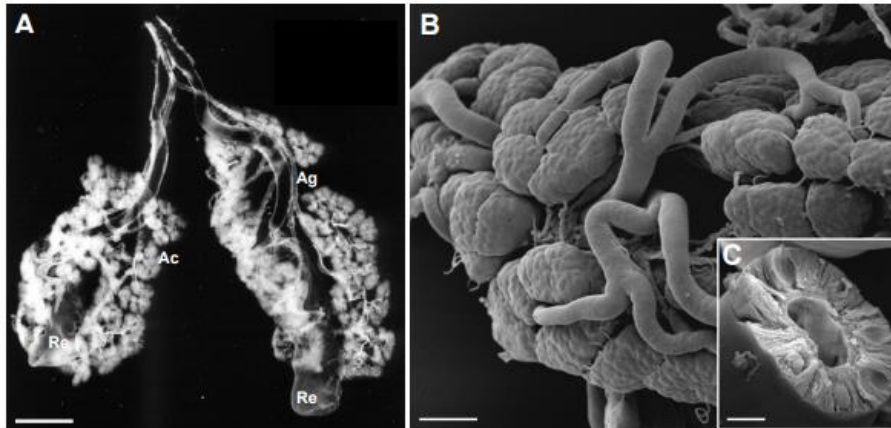


Abbildung 33. Morphologie der Speicheldrüse von *P. AMERICANA*. A: Dunkelfeldaufnahme der paarigen Speicheldrüse, bestehend aus zahlreichen Acini (Ac) und einem verzweigtem Ausführungssystem (Ag) sowie einem paarigen Reservoir (Re), Skala = 1 mm. B: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einzelner Acini und Gänge, Skala = 100 μm . C: Aufgebrochener Ausführungsgang, Balken = 20 μm . Abbildung und Bildunterschrift wurden der Literatur entnommen.^[130]

4 Ergebnisdiskussion

In diesem Kapitel werden die Synthese der Sensor-OS(T)K-Stäbe und deren Ausgangsverbindungen, sowie die Synthese eines Calcium-sensitiven Fluorophors dargestellt. Nach Erläuterungen zur Synthese folgen die jeweiligen Ergebnisse spektroskopischer Untersuchungen und Anwendungen.

4.1 Sensor-OS(T)K-Stäbe

Zur Darstellung von Sensor-OSK-Stäben sollen DBD-Farbstoffe, aufgrund ihrer besonderen spektroskopischen Eigenschaften, kombiniert mit einem Donor oder Akzeptor einen FRET erzeugen. Die Schwierigkeit bei der Auswahl eines geeigneten FRET-Partners ist, dass dieser a) starr an einen OSK-Stab angebunden werden muss, b) die Übergangsdipolmomente in einem geeigneten Verhältnis zueinander stehen müssen und c) die beteiligten Spektren hinreichend überlappen, sodass ein FRET prinzipiell möglich ist. Mögliche FRET-Akzeptoren wie Rhodamin- (**4**) oder BODIPY-Derivate⁶ (**5**) ermöglichen ein besonders langwelliges FRET-Signal, sind jedoch sehr aufwendig herzustellen und zu reinigen. Als Donor-Partner eignen sich vor allem Coumarine (**6**), die sehr variabel funktionalisiert werden können, dadurch einen sehr umfangreichen spektralen Bereich abdecken und leicht zu synthetisieren sind. Daher werden in dieser Arbeit erste Sensor-OSK-Stab-Modellsysteme über das FRET-Paar Coumarin-DBD charakterisiert.

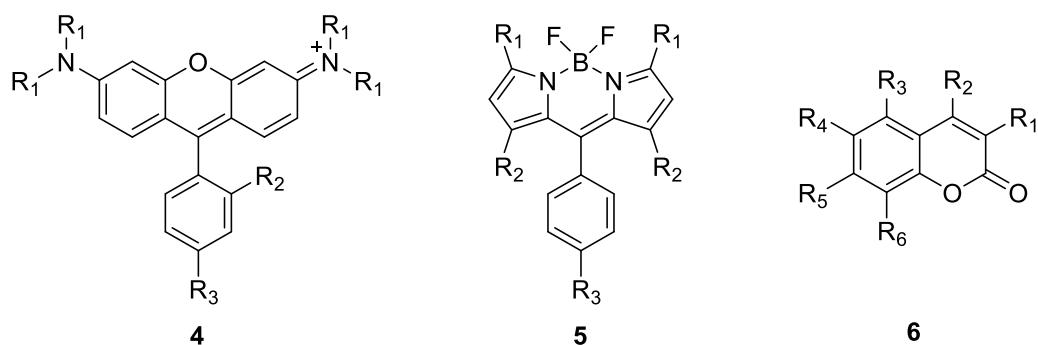
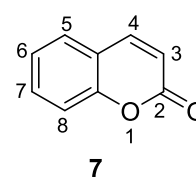


Abbildung 34. Rhodamin (**4**), BODIPY (**5**), Coumarin (**6**).

4.1.1 Coumarinsynthese

Coumarine (Cou), oder 1,2-Benzopyrone, bilden eine sehr große und wichtige Klasse an Verbindungen, die in der Natur weit verbreitet sind. Coumarin (**7**) selbst wurde erstmals im Jahre 1820 aus einer bestimmten Bohnensorte isoliert. Viele Coumarinderivate wurden in einer Vielzahl von Pflanzen gefunden.^[131] Der Grund-



⁶ BODIPY = Boron-dipyrromethan

baustein Coumarin selbst fluoresziert nur sehr gering. Durch Substitution, bevorzugt in der Position 6 und 7 (e-Donoren) bzw. 3 (e-Akzeptoren) werden Emissionswellenlängen zwischen 300 nm - 600 nm erreicht. Aufgrund ihrer guten Fluoreszenzeigenschaften und hohen Quantenausbeuten werden sie z.B. als Farbstofflaser, Fluoreszenzsonden (pH-, polaritäts-, viskositätssensitiv) oder zum optischen Bleichen eingesetzt.^[131,132]

Da bereits kleine Veränderungen im Substitutionsmuster des Coumarin-Gerüsts zur Verschiebung der Fluoreszenzeigenschaften (λ_{abs} , λ_{em} , ϵ , τ_{F} , ϕ_{F}) führen, wird in dieser Dissertation das Coumarin **8** verwendet (Abbildung 35). Die Emissionsbande von **8**^[133] liegt etwa in dem Bereich, in dem gängige DBD-Derivate^[38] absorbieren, was die Grundvoraussetzung für einen erfolgreichen FRET darstellt. Um aus **8** einen „flexiblen“ und einen „starrten“ Coumarin-Baustein, mit annähernd gleichen Fluoreszenzeigenschaften, zu synthetisieren, sollen die Hydroxygruppen in 6- und 7-Position über einen 5-Ring miteinander verbrückt werden (Abbildung 35). Dadurch wird zum einen der Einsatz von Schutzgruppen unnötig, zum anderen bietet das Dioxol-Gerüst eine ausreichende chemische Stabilität für eine große Palette an gängige Synthesesequenzen. Des Weiteren ist die direkte Vergleichbarkeit zwischen **9** und **10** gegeben. Das Übergangsdipolmoment (grüne Pfeile) des starren Bausteins **10** steht außerdem annähernd kollinear zur Richtungsachse (blauer Pfeile).

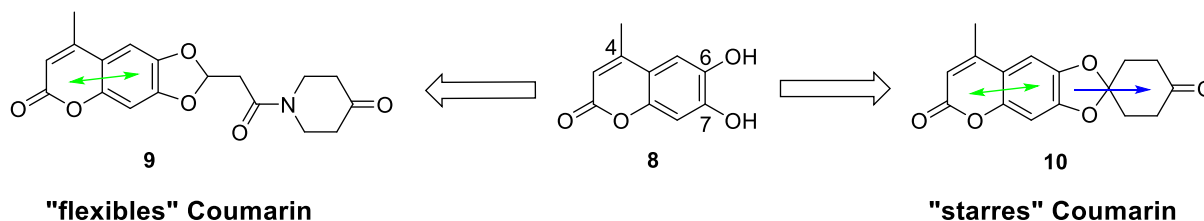


Abbildung 35. Darstellung des flexiblen (**9**) und des starren Coumarins (**10**) aus **8** sowie der Übergangsdipolmomente (grüne Pfeile) und der Richtungsachse (blauer Pfeil).

Die Synthese und Fluoreszenzeigenschaften der Coumarine **9** und **10** werden auf den folgenden Seiten dargestellt und diskutiert.

Darstellung des flexiblen Coumarins

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin **8** wurde der Coumarin-Fluorophor **9** dargestellt, der einen flexiblen Verbinder enthält (Abbildung 36). Verbindung **8** wurde über eine Cyclisierungsreaktion mit dem Benzylpropiolat **11** und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) zu **12** in 90% umgesetzt.^[134] Diese Art der Cyclisierung wurde bereits für mehrere Catechole beschrieben jedoch nie für Coumarine.^[37,38,134–137] Durch die Cyclisierung werden die Sauerstoffatome in 6- und 7-Position stabil über ein Dioxol-Gerüst verbunden. Die Benzylgruppe von **12** wurde hydrogenolytisch mit Pd/C abgespalten und die Säure **13** erhalten. Über die Säuregruppe können zahl-

reiche Funktionalitäten (z.B. Alkine, Azide, Thiole, NHS-Ester⁷) und Linker an den Fluorophor angebracht werden. In diesem Fall wurde über eine DCC-Kupplung⁸ mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) und 4-Hydroxypiperidin der Alkohol **14** erhalten. Das Keton **9** wurde abschließend über Oxidation mittels DESS-MARTIN-Periodinan (DMP) in einer guten Ausbeute von 80% erhalten. Insgesamt konnte **9** über vier Stufen mit einer Ausbeute von 52% synthetisiert werden.

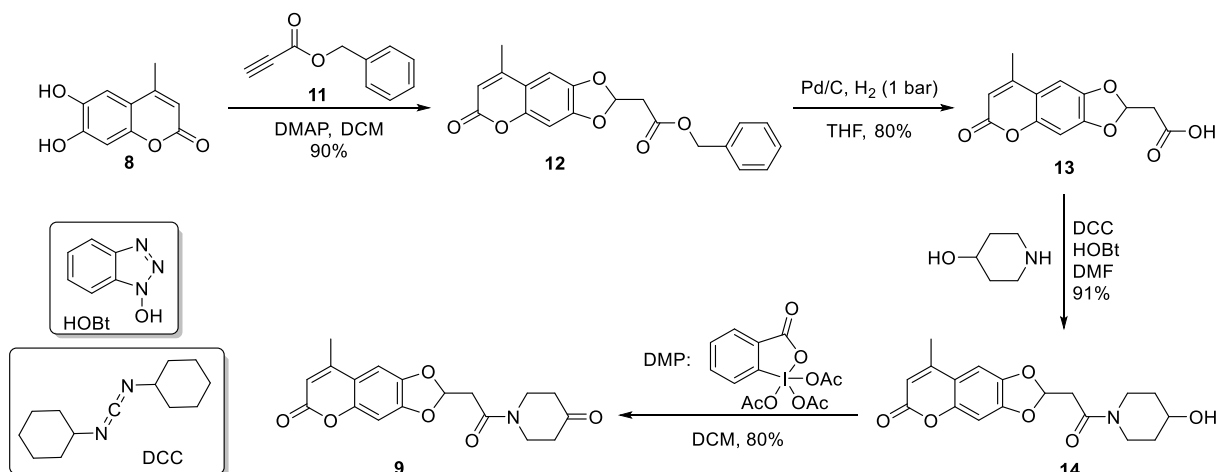


Abbildung 36. Synthese des flexiblen Coumarin-Fluorophors **9**.

Da die Reinigung der Säure **13** aufgrund der hohen Polarität sehr zeitintensiv ist, wurde versucht **14** ohne vorherige Isolierung der Säure **13** darzustellen (Abbildung 37). Dafür wurden die Kupplungsreagenzien HOBT und DCC zusammen mit 4-Hydroxypiperidin direkt nach der Hydrierung von **12** zur Reaktionslösung gegeben und **14** mit einer Ausbeute von 78% erhalten. Die Ausbeute konnte so noch etwas gesteigert werden (**12** → **14** über zwei Stufen = 73%).

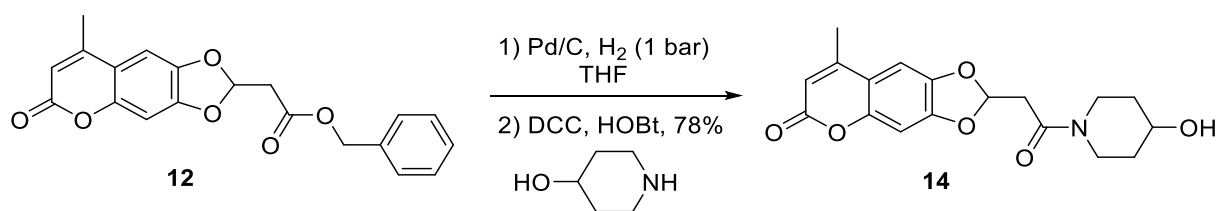


Abbildung 37. Verkürzte Synthese von **14** aus **12**.

Um die Reinigung und den Materialaufwand weiter zu verbessern, sollte **14** über das Säurechlorid **15** synthetisiert werden (Abbildung 38). Die Synthese war jedoch in zwei Versuchen nicht erfolgreich. Wobei hier wahrscheinlich die Herstellung des Säurechlorids bereits nicht geglückt ist. Die Ursache dafür kann in vielen Faktoren zu finden sein. So spielen Reaktionszeit, Temperatur und die Menge

⁷ NHS = N-Hydroxysuccinimid

⁸ DCC = Dicyclohexylcarbodiimid

des Katalysators DMF eine entscheidende Rolle, wodurch es zu Zersetzungen des Coumarins kommen kann. Die Reaktion wurde nicht weiter untersucht.

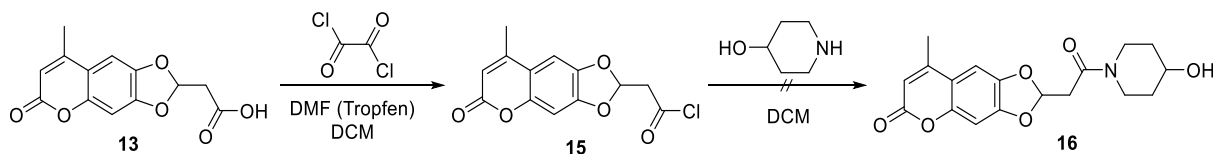


Abbildung 38. Darstellung von **16** über das Säurechlorid **15**.

Darstellung des starren Coumarins

Um das Coumarin **8** starr mit einem OSK-Stab zu verknüpfen, bietet es sich an, das Coumarin direkt mit einem Cyclohexan-Derivat zu koppeln. Somit kann sich das Coumarin nach Anbindung an einen OSK-Stab nicht frei drehen und die spirocyclische OSK-Struktur bleibt erhalten. Um Linearität und Rigidität zu gewähren, eignet sich Verbindung **10** besonders gut. Dafür sollte **8** mit dem Pivaloylgeschützten 4-Hydroxycyclohexanon **18**^[52] über eine Acetalisierung dargestellt werden. Es stellte sich heraus, dass **19** nicht über die Standardacetalisierungs-Methode (A), mit *p*TsOH am Wasserabscheider, hergestellt werden konnte (Abbildung 39). Auch die Acetalisierung über die Doppelaktivierungsmethode (B) erzielte das gewünschte Produkt nicht in ausreichender Ausbeute. Hier wurden lediglich 10% von **19** erhalten. Dies lässt sich auf die schlechte Löslichkeit von **8** in Et₂O zurückführen. Der Austausch des Lösungsmittels mit MTBE führte ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt.^[138] Die Doppelaktivierungsmethode ist auf die Verwendung von Ether-Lösungsmitteln beschränkt, weshalb der Einsatz von Lösungsmitteln wie DCM oder CHCl₃, in denen sich **8** gut löst, nicht möglich ist.

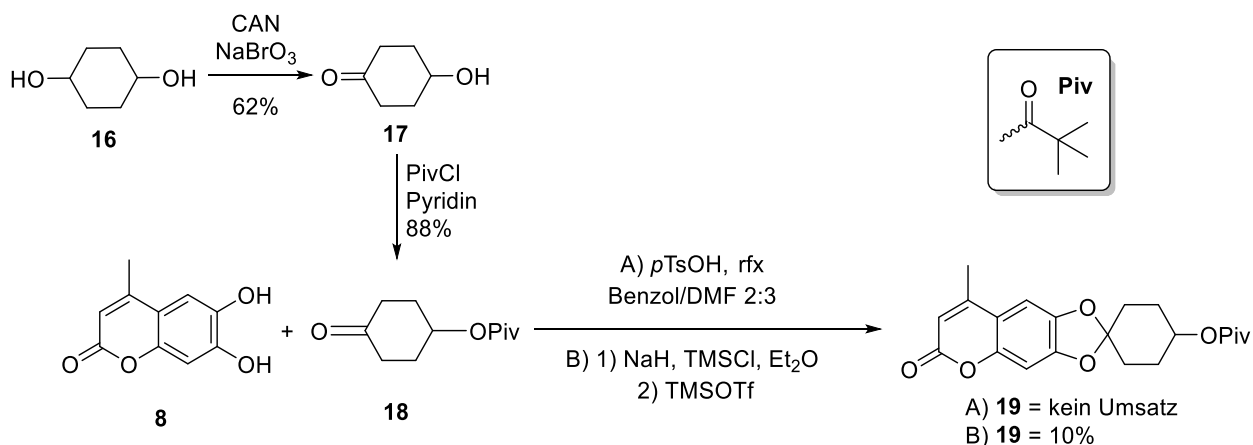


Abbildung 39. Darstellung von **19** über A: Standardacetalisierung, B: Doppelaktivierung; rfx = unter Rückfluss erhitzt, CAN = (NH₄)₂Ce(NO₃)₆^[139].

Eine weitere erfolgsversprechende Acetalisierungsmethode stellt die NOYORI-Acetalisierung dar, die anstelle eines Diols den entsprechenden Trimethylsilylether verwendet. Dafür wurde **8** quantitativ in

das Silan **20** überführt (Abbildung 40). Die anschließende Acetalisierung, katalysiert mit TMSOTf, ergab **19** mit einer Ausbeute von 95%. Die Ausbeute schwankte bei der Reproduktion jedoch sehr stark. Es wurden Ausbeuten zwischen 25% und 95% erhalten. Eine Ausbeute um 50% konnte in den meisten Fällen erhalten werden und wird als realistisch betrachtet. Der Grund für die schwankenden Ausbeuten ist wahrscheinlich beim TMSOTf zu finden. Schon kleine Mengen des Hydrolyseprodukts (H^+) hydrolysieren den TMS-Ether **20** zum Ausgangsprodukt **8**, welches unter NOYORI-Bedingungen unreaktiv ist und in den verwendeten Lösungsmitteln ausfällt. Des Weiteren verläuft die Acetalisierung über NOYORI am Aromaten sehr langsam, was bereits in vielen Vorexperimenten zur Darstellung von DBD-Muffen von K. MÖLLNITZ^[138] festgestellt wurde. Diese beiden Bedingungen begünstigen die Entstehung des Edukts **8** und führen zu geringen und schwankenden Ausbeuten von **19**.

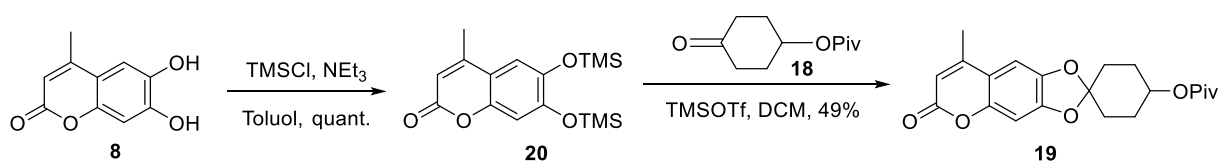
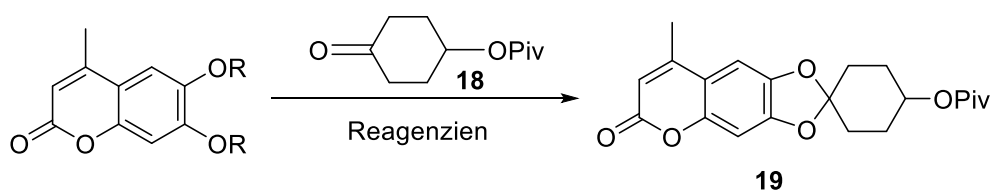


Abbildung 40. Darstellung von **19** über NOYORI-Acetalisierung.

Die Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **19** wurden nach Tabelle 1 variiert. Gerade bei der Synthese von OSK-Bausteinen hat sich die Verwendung von Et_2O als Lösungsmittel bei der NOYORI-Acetalisierung bewährt.^[52] Verbindung **19** konnte in Et_2O jedoch nur mit 22% dargestellt werden. Bezüglich der Geschwindigkeit der NOYORI-Acetalisierung wurde von WESSIG *et al.* gezeigt, dass sich die benötigte Zeit der Acetalisierung durch Refluxieren in Toluol stark verkürzte.^[42]

Tabelle 1. Darstellung von **19** unter verschiedenen Synthesebedingungen



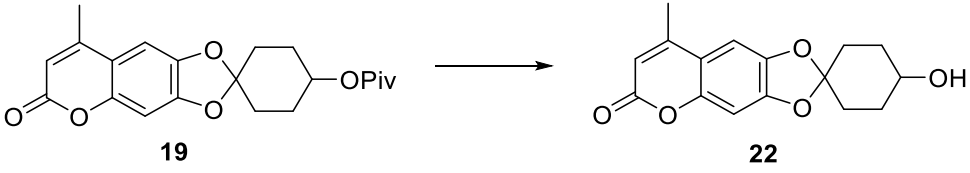
Eintrag	R	LM	Reagenz	Temperatur	Ausbeute
1	TMS	Et_2O	TMSOTf	RT	22%
2	TMS	DCM	TMSOTf	RT	25% – 95%
3	TMS	Toluol	TMSOTf	rfx	8%
6	H	DCM	$BF_3 \cdot Et_2O$, Orthoformiat	RT	20%
7	H	Toluol	PPTSA	130 °C	11%

21 (Wasserabscheider)

RT = Raumtemperatur, rfx = unter Rückfluss erhitzt, PPTSA = Pyridinium-*p*-toluolsulfonat

Die Anwendung zeigte im Falle von **19** jedoch keine zufriedenstellende Ausbeute. Die stöchiometrische Verwendung von $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ erbrachte ebenfalls nur eine 20%ige Ausbeute. Des Weiteren wurde versucht, Verbindung **19** über eine Umacetalisierung aus dem Dimethylacetal **21** und Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTSA) zu gewinnen, was ebenfalls nur 11% an **19** erbrachte. Die Abspaltung der Pivaloyl-Schutzgruppe erfolgt standardmäßig und meist quantitativ mittels Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL). DIBAL kann für das Coumarin **19** jedoch nicht verwendet werden, da es das Lacton reduziert.^[140] Wie in Tabelle 2 dargestellt, wurden mehrere Basen zur Abspaltung der Pivaloyl-Schutzgruppe von **19** getestet. Die beste Ausbeute wurde mit LiOH in MeOH erzielt. Bei allen Reaktionen entstanden sehr polare fluoreszierende Coumarin-Derivate, die wahrscheinlich auf eine Zersetzung des Coumarin-Gerüsts zurückzuführen sind. Daher wird empfohlen, die Reaktion in max. 48 h durchzuführen.

Tabelle 2. Entschützung von **19**



Eintrag	LM	Reagenz	Bedingungen	Ausbeute
1	H ₂ O/THF 1:1	4 eq. KOH	RT, 24 h	47%
2	EtOH	4 eq. KOH	RT, 24 h & rfx, 6 h	22%
3 ^[141]	THF/MeOH 2:1	3 eq. KOH, 0.5 eq. NaClO ₄	RT, 24 h	39% - 81%
4	MeOH	5 eq. NaOH (0.5 M)	RT, 24 h	55%
5 ^[142,143]	Dioxan/H ₂ O 2:1	2 eq. NBu ₄ OH	RT, 24 h & rfx, 4 h	45%
6	MeOH	3 eq. LiOH	RT, 24 h	94%

RT = Raumtemperatur, rfx = unter Rückfluss erhitzt

Die Oxidation von **22** zum Keton **10** verlief über SWERN- und DESS-MARTIN-Oxidation in guten Ausbeuten (Abbildung 41). Insgesamt konnte **10** über vier Stufen mit einer Ausbeute von 80% erhalten werden.

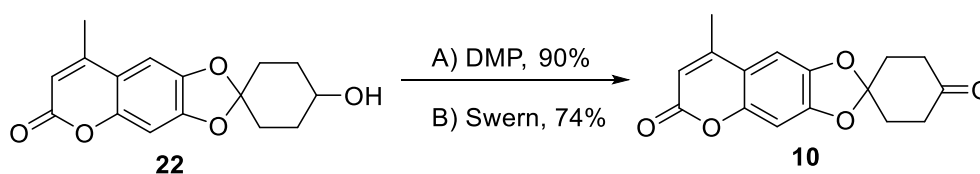
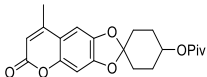
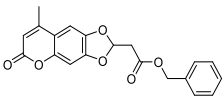


Abbildung 41. Darstellung des Ketons **10**.

4.1.2 Spektroskopische Eigenschaften der Coumarine

Die spektroskopischen Eigenschaften der Coumarine **12** und **19** wurden in unterschiedlichen Lösungsmitteln untersucht (Tabelle 3). Die Absorptions- (λ_{abs}) und Emissionsmaxima (λ_{em}) unterscheiden sich zwischen den dargestellten polaren und unpolaren Lösungsmitteln kaum. Die Fluoreszenzlebensdauern (τ_{F}) liegen im Bereich von $0.8 \geq \tau_{\text{F}} \leq 2.0$ ns. Die guten Fluoreszenzeigenschaften der Coumarine **19** und **12** resultieren aus den elektronen-schiebenden Eigenschaften der Alkoxygruppen in 6- und 7-Position, die einen intramolekularen Ladungstransfer zum Lacton ("push-pull"-System) nach Lichtabsorption ermöglichen.^[144] Die Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer nehmen mit steigender Polarität des Lösungsmittels zu, was in der verbesserten Stabilisierung des elektronisch-angeregten Zustands in polaren Lösungsmitteln begründet ist.^[145] In weniger polaren bzw. unpolaren Lösungsmitteln liegt der $^1(\pi\pi^*)$ -Zustand kurz über dem Triplettzustand $^3(n\pi^*)$, sodass die ICS-Rate relativ hoch ist. Dahingegen verändert sich der energetische Abstand beider Zustände in polaren Lösungsmitteln, sodass $^1(\pi\pi^*)$ unterhalb von $^3(n\pi^*)$ liegt und ICS nicht mehr ausreichend konkurrenzfähig ist.^[132,146]

Tabelle 3. Spektroskopische Eigenschaften der Coumarine **19** und **12**

Verbindung	LSM	λ_{abs} / nm	λ_{em} / nm	$\Delta\lambda$	τ_{F} / ns	$\phi_{\text{F}}^{\text{a}}$	ϵ / $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\phi_{\text{F}} \cdot \epsilon$ / $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
19 	CHCl ₃	348	410	62	1.7	-	-	-
	DCM	346	405	59	1.2	0.21	9325 ± 60	-
	Aceton	346	400	54	1.2 ^a	-	-	-
	DMSO	344	415	71	1.3	0.26	13239 ± 400	3442
	ACN	344	410	66	1.2 ^a	0.15	12595 ± 180	1889
	MeOH	345	412	67	2.0 ^a	0.36	12811 ± 140	4611
	PBS ^a	344	416	72	4.1	0.58	-	-
	LUV ^a	344	414	70	3.8	0.64	-	-
12 	DCM	342	400	58	0.8 ^a	0.11	10425 ± 110	1147
	DMSO	343	413	73	0.8 ^a	0.23	10878 ± 60	2502
	ACN	340	410	70	0.8 ^a	-	13355 ± 40	-
	MeOH	342	407	65	1.8 ^a	0.27	12237 ± 150	3304

^a vermessen von URSULA EISOLD⁹; $\Delta\phi_{\text{F}} = \pm 0.03$; PBS= phosphatgepufferte Salzlösung; LUV = large unilamellar vesicles

Im Gegensatz zu 7-aminosubstituierten Coumarinen, in denen zusätzlich eine Torsionsbewegung der Aminogruppe die Photophysik beeinflusst und so neben der Polarität auch Viskositätseffekte einen

⁹ URSULA EISOLD, Arbeitskreis für Physikalische Chemie, Institut für Chemie, Universität Potsdam

Einflussfaktor darstellen, sind die AlkoxyCoumarine einzig gegenüber der Polarität des Lösungsmittels empfindlich. Auf dieser Grundlage kann eine eindeutige Zuordnung von Umgebungseinflüssen für die geplanten Sensorik-Anwendungen der OSK-Stäbe erhalten werden. Verbindung **19** wurde des Weiteren in *large unilamellar vesicles* sog. LUV (bestehend aus DOPC und DOPS in PBS,¹⁰ Durchmesser ca. 100 nm)^[147], die ein einfaches Modellsystem für Zellmembranen darstellen, spektroskopisch untersucht. Die spektralen Eigenschaften unterscheiden sich nur geringfügig gegenüber denen in PBS-Pufferlösung. Die relativ lange Lebensdauer (3.8 ns) und hohe Quantenausbeute (0.64) bilden gute Voraussetzungen für FRET-Untersuchungen in Vesikel.

4.1.3 DBD-Synthese

Aufgrund ihrer herausragenden photophysikalischen Eigenschaften ($\lambda_{em} > 500$ nm, 1 ns $\leq \tau_F \leq 25$ ns, STOKES-Shift > 100 nm, Bleich-Stabilität) bieten DBD-Farbstoffe ein hohes Potential für verschiedenste biologische Anwendungen. Durch den Einbau von elektronenziehenden Gruppen (EWGs, rot) am Chromophor, lassen sich die Fluoreszenzeigenschaften variieren (Abbildung 42). Zwei wichtige Vertreter der von WESSIG *et al.* vorgestellten DBD-Farbstoffe stellen die sogenannten Acyl- und Ester-DBD-Fluorophore dar, die sich sehr variabel funktionalisieren lassen (blaue Markierung).^[37,38]

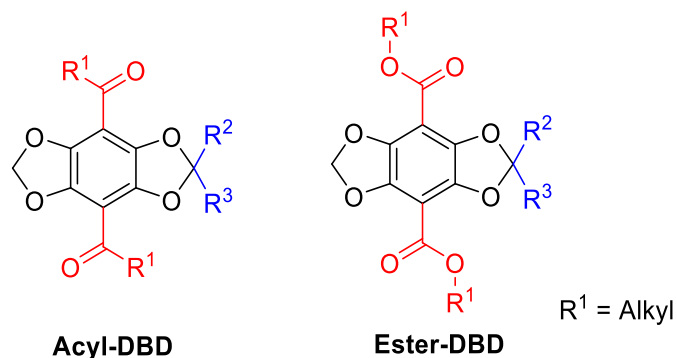
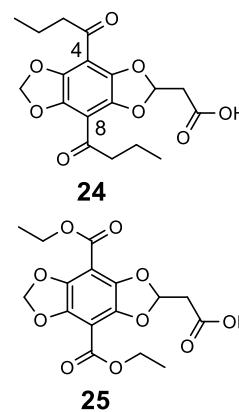


Abbildung 42. Struktur der Acyl- und Ester-DBD.

Die Acyl-DBD-Fluorophore (**24**) tragen in 4- und 8-Position Acylgruppen und zeichnen sich vor allem durch ihre ausgeprägte Sensitivität gegenüber der Umgebungspolarität aus. Während sie in polaren Lösungsmitteln kaum fluoreszieren ($\tau_{F,H_2O} = 1.5$ ns, $\phi_{F,H_2O} < 0.05$, **24**), steigert sich die Fluoreszenzintensität in unpolaren Lösungsmitteln immens ($\tau_{F,DCM} = 24.8$ ns, $\phi_{F,DCM} = 0.35$, **24**). Des Weiteren zeigen sie einen ausgeprägten Solvatochromieeffekt, wobei sich das Emissionsmaximum mit steigender Polarität des Umgebungsmediums bathochrom verschiebt ($\lambda_{em,H_2O} = 640$ nm, $\lambda_{em,DCM} = 548$ nm, **24**) und STOKES-

Shifts von annähernd 200 nm im wässrigen Medium entstehen. Die Ester-DBD-Fluorophore (**25**)



¹⁰ DOPS = 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin, DOPC = 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin

tragen in 4- und 8-Position Estergruppen und zeigen, im Gegensatz zu Acyl-DBDs, sowohl in polaren als auch in unpolaren Medien hohe Fluoreszenzlebensdauern ($\tau_{F,H_2O} = 20.5$ ns, $\tau_{F,DCM} = 17.8$ ns, **25**) und -quantenausbeuten ($\phi_{F,H_2O} = 0.63$, $\phi_{F,DCM} = 0.75$, **25**). Ein bathochromer Shift der Emissionswellenlänge ist auch hier von unpolaren zu polaren Lösungsmitteln zu beobachten ($\lambda_{em,DCM} = 488$ nm, $\lambda_{em,H_2O} = 528$ nm, **25**). Insgesamt sind die Absorptions- und Emissionsmaxima der Ester-DBD-Fluorophore hypsochrom (zu kürzeren Wellenlängen) zu den Acyl-DBD-Fluorophoren verschoben. Die bathochrome Verschiebung mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels lässt sich durch eine Verringerung des energetischen Abstands zwischen dem elektronischen Grundzustand S_0 und dem angeregten Zustand (aufgrund der Wechselwirkung zwischen den Dipolmomenten von Lösungsmittel und Fluorophor) erklären, wodurch weniger Energie zur Absorption benötigt wird.

Damit DBD-Fluorophore fluoreszieren können müssen sie jedoch ein teilweise starres Grundgerüst aufweisen (Abbildung 43).^[37,38]

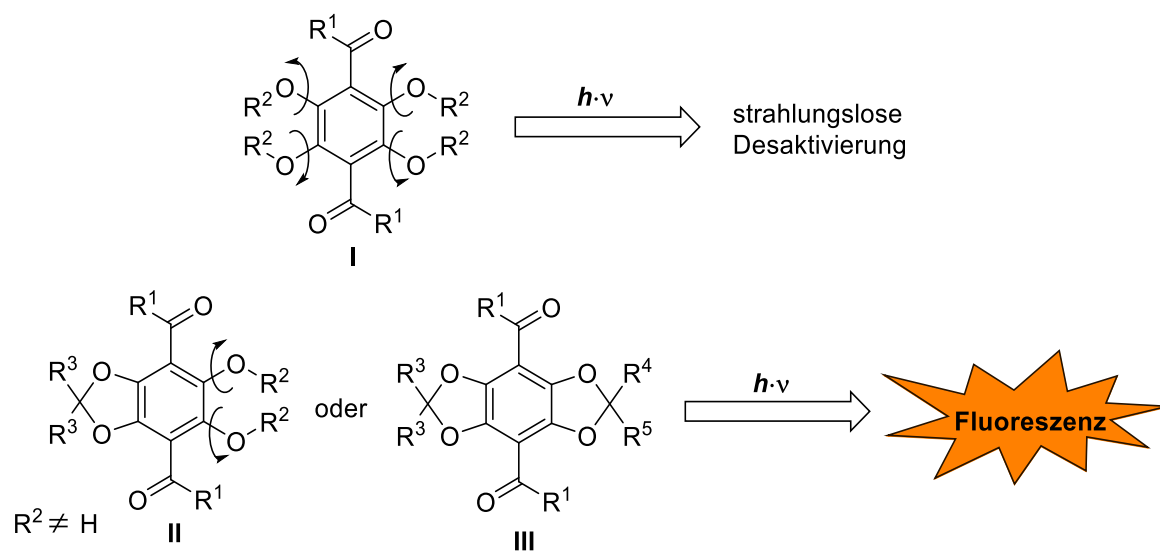


Abbildung 43. Ursache der Fluoreszenz von BD- (II) und DBD- (III) Fluorophoren.

Verbindungen des Typs I zeigen keine Fluoreszenz, wohingegen Verbindungen aufbauend auf BD- (1,3-Benzodioxol, II) und DBD-Gerüsten (III), deren Sauerstoffatome ein- bzw. beidseitig CH_2 -verbrückt sind, fluoreszieren. Letztere werden in ihren Rotations- und Schwingungsfreiheitsgraden so stark eingeschränkt, dass das angeregte Molekül vorwiegend unter Fluoreszenz desaktiviert wird. Erste BD- und DBD-Derivate wurden von DALLACKER *et al.* publiziert, jedoch nicht photo-physikalisch charakterisiert.^[148,149]

Zur Darstellung von DBD-Bausteinen, die sowohl flexibel (**26**) als auch starr (**27**) an ein OSK-Gerüst angebracht werden können, sollen folgende DBD-Fluorophore synthetisiert werden:

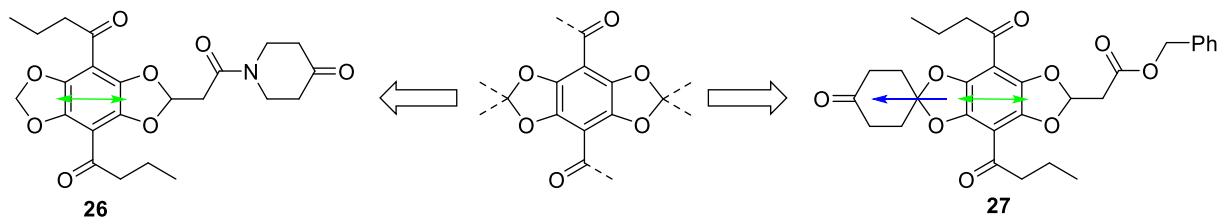


Abbildung 44. Darstellung des flexiblen (**26**) und des starren DBD-Fluorophors (**27**) sowie der Übergangsdipolmomente (grüne Pfeile) und der Richtungsachse (blauer Pfeil).

Durch die Verwendung der Acyl-DBD-Fluorophore können gleichzeitig umgebungsspezifische Informationen aus dem Fluoreszenzsignal gewonnen werden. Daher wurde für erste Sensor-OSK-Modelle der Acyl-DBD verwendet. Die Strukturen von **26** und **27** sind der der Coumarine **9** und **10** nachempfunden, sodass der flexible Linker der Bausteine **26** und **9**, als auch die starre Verknüpfungseinheit (Cyclohexanon-Baustein) von **27** und **10** identisch sind. Besonders hervorzuheben ist, dass das Übergangsdipolmoment (grüne Pfeile) des starren DBD-Bausteins annähernd kollinear zur Richtungsachse (blauer Pfeil) steht, wie es auch beim starren Coumarin **10** der Fall ist. Werden beide Fluorophore starr über einen OSK-Stab miteinander verbunden, kann κ^2 annähernd das Maximum von 4 erreichen und damit das Modell des kollinearen FRET-Systems aus Kapitel 3.2.3 Abbildung 21 realisiert werden.

Synthese des flexiblen DBD-Fluorophors

Der flexible DBD-Baustein **26** wurde über eine teils bekannte Syntheseroute dargestellt (Abbildung 45).^[38]

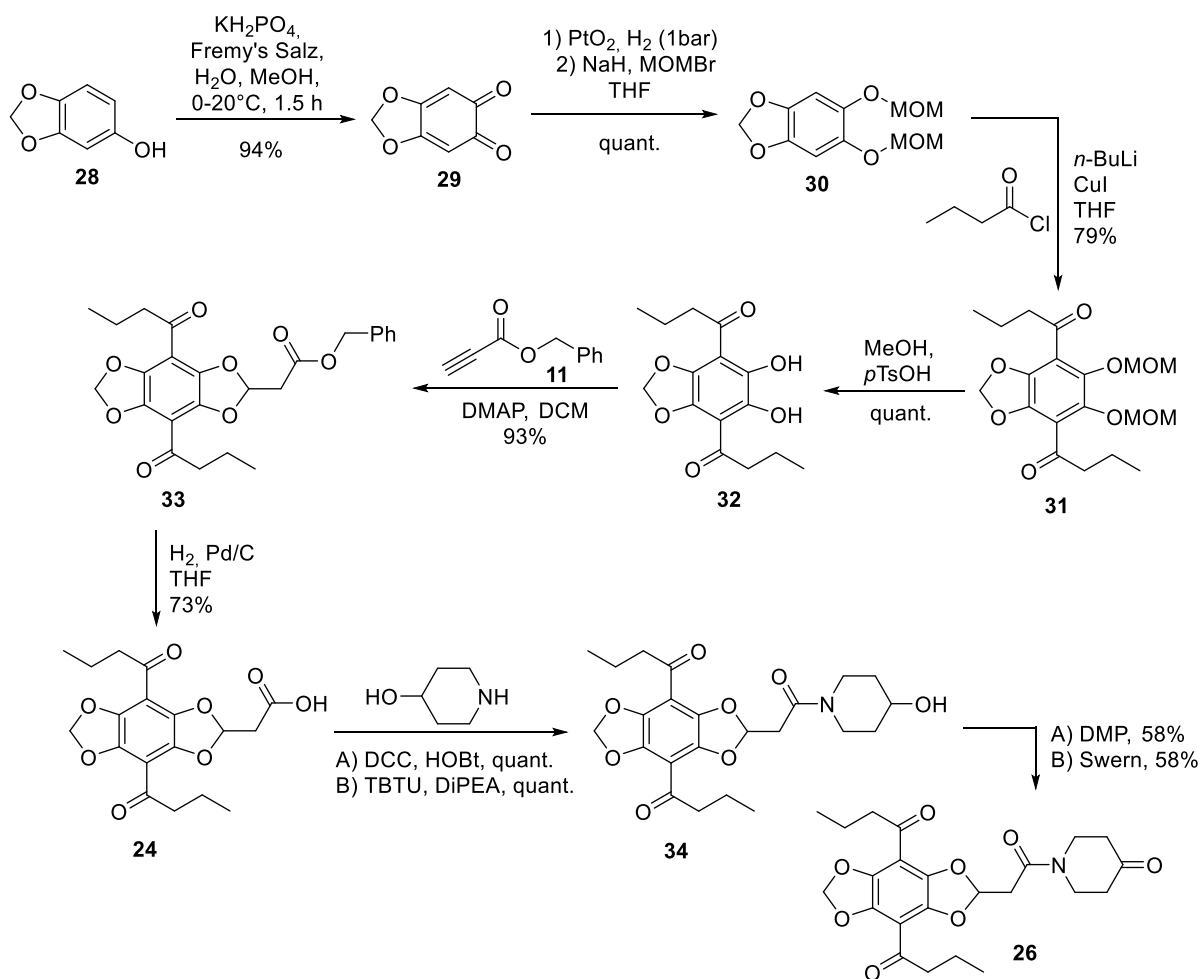


Abbildung 45. Synthese des flexiblen DBD-Fluorophors **26**.

Die Umsetzung von Sesamol **28** mit FREMY'S SALZ (Kaliumnitrosodisulfonat) ergab das Chinon **29** in einer sehr guten Ausbeute von 94%. Die anschließende Hydrierung und Schützung mit der Methoxymethyl- (MOM) Schutzgruppe erfolgte quantitativ. Die Einführung der Acylgruppen wurde über die Bildung der GILMAN-Cuprate und anschließender Zugabe des Säurechlorids in 79% ermöglicht. Das GILMAN-Cuprat verhindert die Weiterreaktion des Ketons mit überschüssigem *n*-BuLi und setzt die Reaktivität herab. Nach quantitativer Abspaltung der MOM-Schutzgruppe, Ringschluss über eine Cyclisierung mit DMAP/ Benzylpropiolat **11** und darauffolgender Abspaltung der Benzylgruppe wurde der Literaturbekannte DBD-Fluorophor **24** mit sehr guten Ausbeuten synthetisiert (Abbildung 45).^[38] Die Einführung des 4-Hydroxypiperidins mittels A) DCC/HOBt, als auch B) TBTU/DIPEA erfolgten quantitativ. Die Oxidationen über SWERN und DESS-MARTIN ergaben das Zielprodukt **26** mit 58%. In beiden Fällen entstanden keine Nebenprodukte, sodass das nicht umgesetzte Edukt **34** vollständig

zurückgewonnen werden konnte. Die Ausbeute der DESS-MARTIN-Oxidation konnte auch durch Erhöhung der eingesetzten Äquivalente an DESS-MARTIN-Periodinan nicht gesteigert werden. Verbindung **26** wurde über acht Stufen mit einer Ausbeute von 36% erhalten.

Synthese des starren DBD-Fluorophors

Zur Darstellung des starren DBD-Fluorophors **27**, welcher über ein Cyclohexanon linear an einen OSK-Stab angebracht werden kann, ergeben sich synthetisch einige Schwierigkeiten, die im Arbeitskreis WESSIG in der Vergangenheit bereits eingehend diskutiert wurden. Anhand Abbildung 46 soll dieser Sacherhalt beschrieben werden.

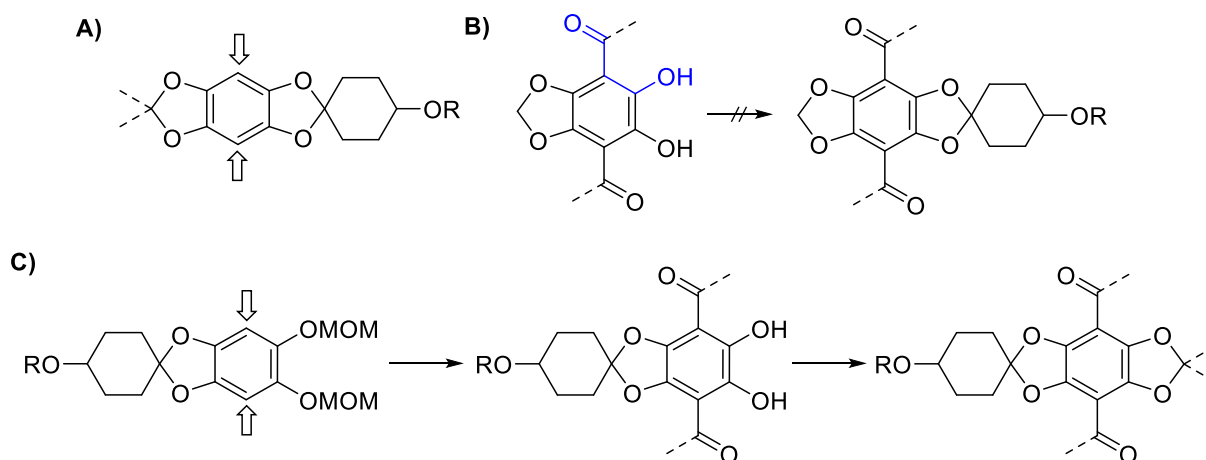


Abbildung 46. Varianten zur Einführung beidseitig starrer Segmente am DBD-Fluorophor.

Nach Variante A werden die funktionellen Gruppen (Acyle, Ester usw.) an den beidseitig geschlossenen DBD-Chromophor eingeführt. K. MÖLLNITZ und R. WAWRZINEK führten diesbezüglich entsprechende Experimente durch, die in Abbildung 47 dargestellt sind.^[37,134,142] Zur Einführung der Substituenten wurde das DBD-Derivat **35** zunächst mittels *n*-BuLi lithiiert, infolgedessen wurde durch Zugabe von A) CuI das GILMAN-Cuprat gebildet (Herabsetzung der Reaktivität) und schließlich das entsprechende Säurechlorid hinzugegeben^[138], B) CO₂ eingeleitet um die DBD-Säure herzustellen^[150], C) das Acyl über ein Weinrebamid **36** eingeführt^[37]. Lediglich die di-funktionalisierte DBD-Säure (**38b**) konnte in einer höheren Ausbeute als die mono-funktionalisierte (**37b**) erhalten werden. Im Falle der Acylierungen wurden hauptsächlich die mono-funktionalisierten Produkte (**37a**, **37c**) erhalten. Aufgrund dessen dass die Sauerstoffatome über die Dioxolane gebunden sind, wird das Lithiumion während der Lithiierung ungenügend komplexiert, weshalb die zweite Lithiierung wahrscheinlich kinetisch gehemmt ist und das restliche *n*-BuLi wahrscheinlich mit dem Lösungsmittel (THF) abreagiert (Abbildung 48).

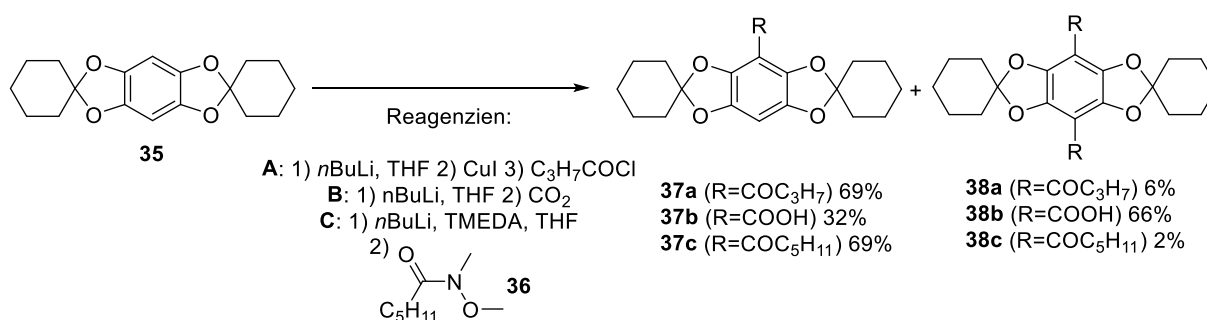


Abbildung 47. Funktionalisierung des DBD-Derivates **36**. [37,138,150]

Sind die Sauerstoffatome jedoch teilweise unverbrückt (**40**) und, wie in Abbildung 48, über Methyl-Schutzgruppen geschützt, so wird die lithiierte Spezies stärker durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Auf dieser Grundlage können in 4- und 8-Position di-funktionalisierte DBD-Derivate in sehr guten Ausbeuten in THF dargestellt werden (Vergleich: Abbildung 45, Verbindung **31**).

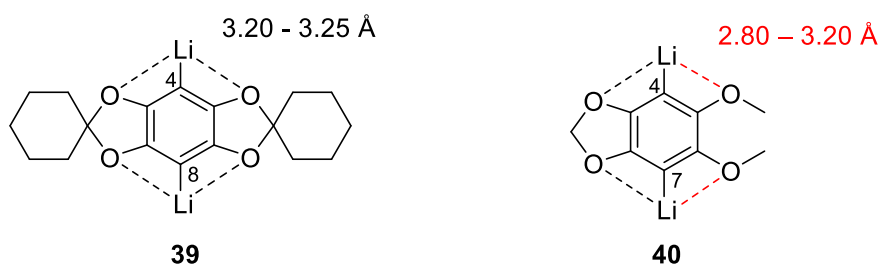


Abbildung 48. Komplexierung der lithiierten Spezies von **39** und **40** und berechnete Abstände. [138]

Aufgrund neuester Erkenntnisse von L. JOHN lässt sich der DBD-Dialdehyd **42a** über die in Abbildung 49 dargestellte Syntheseroute mit einer Ausbeute von 71% herstellen. Das hier verwendete Lösungsmittel Hexan reagiert im Gegensatz zu THF nicht mit *n*-Buli.^[151] Der Arbeitskreis WESSIG forscht weiterhin an Möglichkeiten zur symmetrischen als auch asymmetrischen Di-Funktionalisierung von DBD-Derivaten nach Variante A. Dies sollte jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

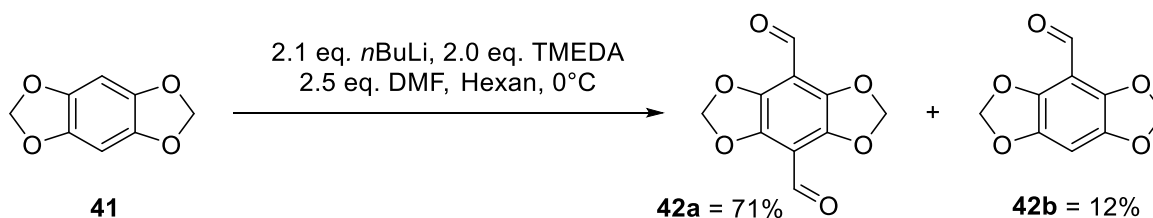


Abbildung 49. Darstellung des DBD-Dialdehyds **42a**. [142]

Eine weitere mögliche Überlegung stellt Variante B (Abbildung 46) dar, bei der das Catechol durch säurekatalytische Acetalisierung mit einem funktionalisierten Cyclohexanon-Derivat die gewünschte starre Anknüpfungseinheit erhält. Aufgrund der zu den Sauerstoffatomen benachbarten Acyl-

Gruppen (blau) ähneln die chemischen Eigenschaften des Catechols jedoch eher einer Carbonsäure, weshalb die Umsetzung mit Carbonylverbindungen durch Acetalisierung kaum möglich ist.^[135] Um dennoch die Sauerstoffatome miteinander zu verbrücken und gleichzeitig die Möglichkeit zur Funktionalisierung zu haben, haben sich Cyclisierungen mit Acetylendicarbonsäuredimethylester (**43**) über DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)^[136] oder Propiolate über DMAP^[134] bewährt (Abbildung 50). Die Cyclisierungsprodukte stellen jedoch keine Lösung zur Synthese von **27** dar.

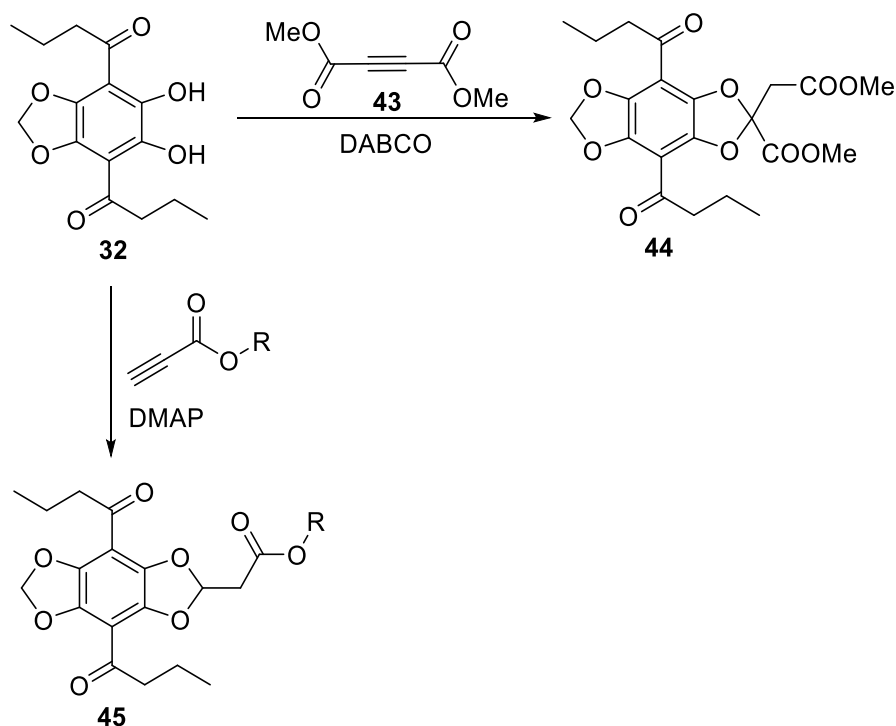


Abbildung 50. Darstellung der DBD-Derivate **44** und **45**.

In Variante C (Abbildung 46) wird das BD-Edukt als erstes einseitig mit der erforderlichen funktionalisierten Cyclohexan-Einheit umgesetzt, um anschließend analog zur Acyl-DBD-Synthese in Abbildung 45 in 4- und 7-Position funktionalisiert werden zu können. Die anschließende Cyclisierung des Catechols führt zum gewünschten „starrten“ DBD-Baustein, daher wird Variante C zur Synthese von **27** verwendet. Wichtig ist hierbei die Wahl der richtigen Schutzgruppe am Sauerstoff des Cyclohexanrings. R. WAWRZINEK und D. GERICKE zeigten, dass die Benzyl-Schutzgruppe ungeeignet ist, da es in Folge der Lithiierung zur [1,2]-WITTIG-Umlagerung kommt (Abbildung 51).^[150,152] Um derartige Nebenreaktionen zu verhindern, fiel die Wahl auf die TBDMS-Schutzgruppe, die einen Angriff seitens des Lithiums keine Möglichkeit bietet.

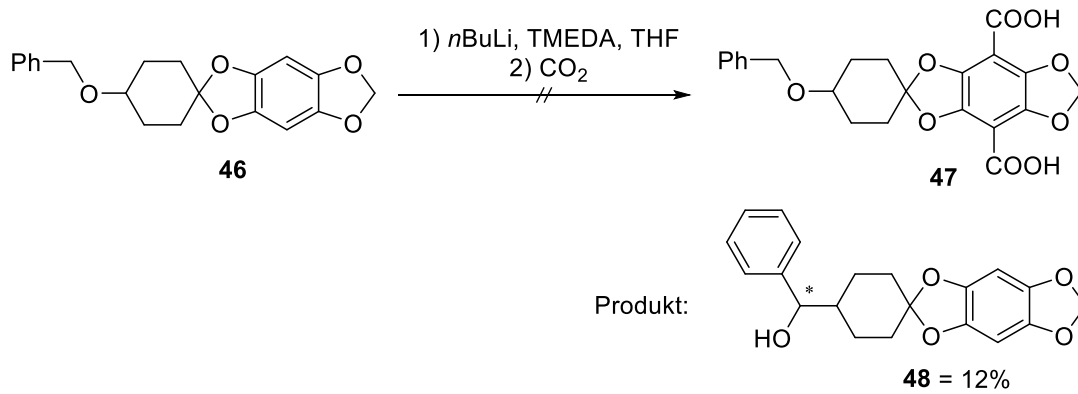


Abbildung 51. Produkt der [1,2]-WITTIG-Umlagerung nach Lithiierung von **46**.^[143,144]

Zur Darstellung von **51**, dem Sesamol (**28**)-Analogon aus Abbildung 45, wurde **49** zunächst einseitig oxidiert und mit TBDMSCl quantitativ zum TBDMS-geschützten Keton **50** umgesetzt. Die anschließende Umsetzung mit 1,2,4-Trihydroxybenzol und *p*TsOH am Wasserabscheider ergab **51** mit lediglich 14%.

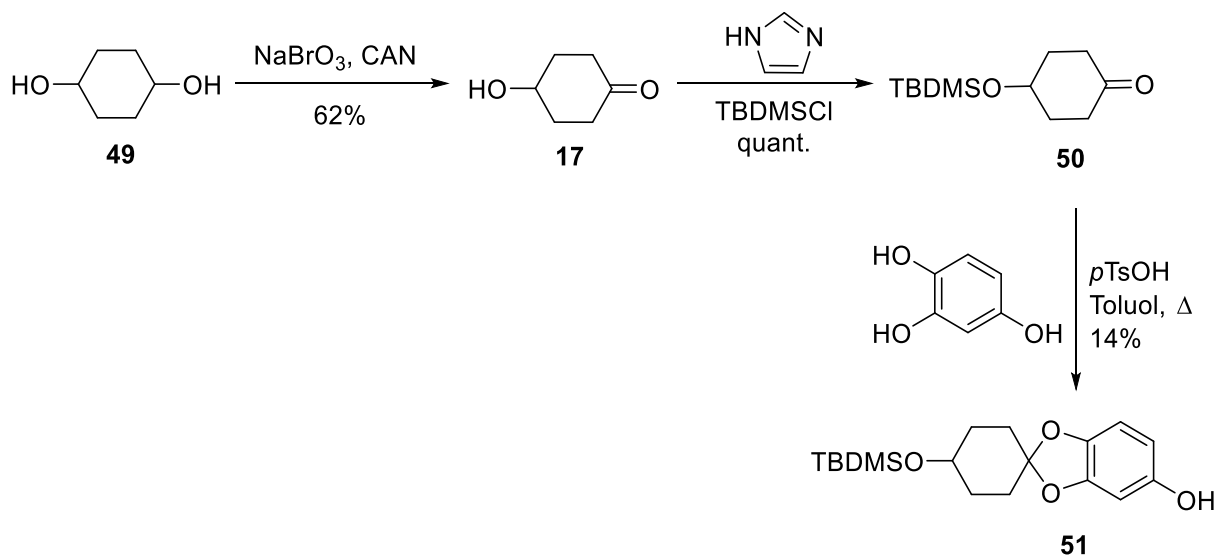


Abbildung 52. Synthese von **51**.

Dieses Problem konnte durch eine Umacetalisierungsreaktion mit dem Dimethylacetal **52** und PPTSA, durch kontinuierliche Destillation des entstehenden Methanols, gelöst werden. Verbindung **51** wurde mit einer Ausbeute von 95% erhalten (Abbildung 53).

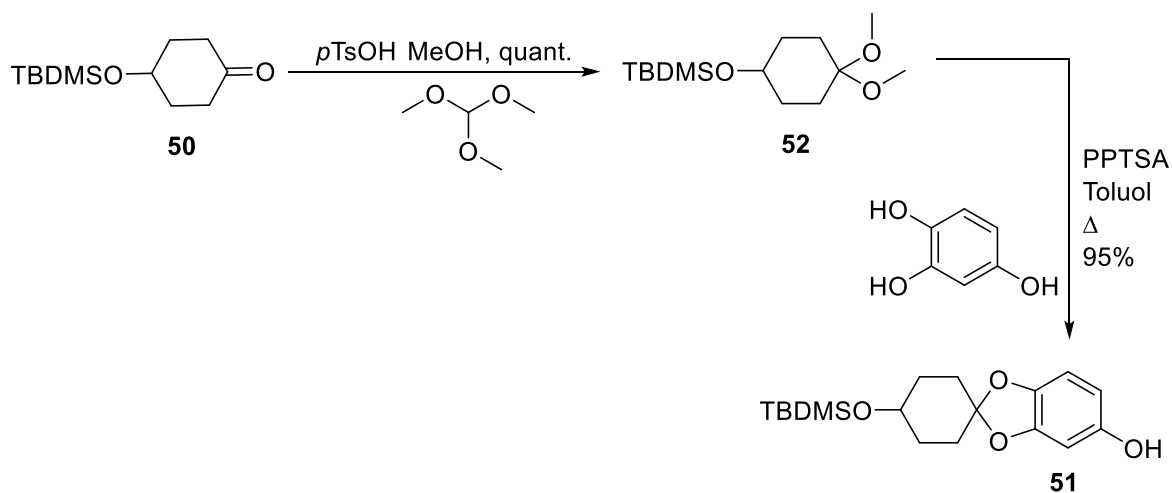


Abbildung 53. Alternative Synthese von **51**.

Auf dieser Grundlage wurde der starre DBD-Baustein **27** analog zur DBD-Synthese in Abbildung 45 hergestellt. Verbindung **51** wurde mittels FREMY'S SALZ oxidiert und anschließend mit PtO_2 in THF hydriert.

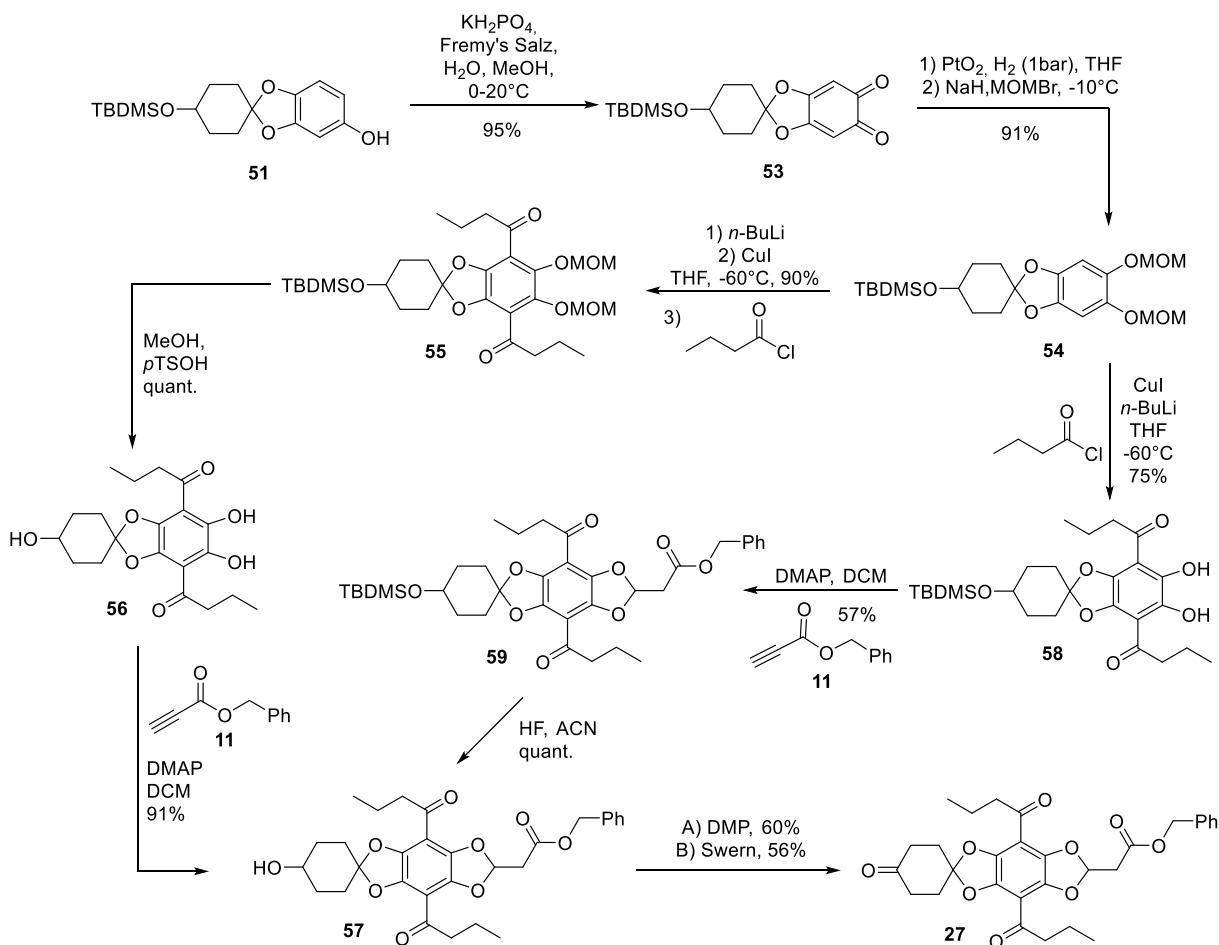


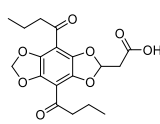
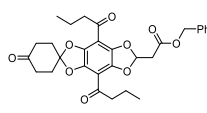
Abbildung 54. Synthese des starren DBD-Fluorophors **27**.

Das Catechol wurde sofort mit NaH und Brommethylmethylether (MOMBr) zum MOM-geschützten Catechol **54** in sehr guter Ausbeute umgesetzt. Die Acylierung über das GILMAN-Cuprat und Butyrylchlorid machte das diacylierte Produkt **55** in 90% zugänglich. Bei der Aufarbeitung können jedoch die MOM-Schutzgruppen abgehen, weshalb **58** in einigen Chargen entstanden ist. Um den Verlust der MOM-Schutzgruppe zu vermeiden, bietet es sich an, bei der Aufarbeitung mit ammoniakalischer-Lösung zu arbeiten und NaCO₃ vor der Entfernung des Lösungsmittels hinzuzugeben. Die MOM- und TBDMS-Schutzgruppe lassen sich durch katalytische Mengen an *p*TsOH quantitativ abspalten. Die Cyclisierung nach ARIZA *et al.* mit 1 eq. Benzylpropiolat **11** und DMAP erfolgte selektiv am Catechol.^[134] Durch Oxidation von **57** wurde der starre DBD-Fluorophor mit einer Gesamtausbeute von 25% ausgehend von **49** über 10 Stufen erhalten.

4.1.4 Spektroskopische Eigenschaften von DBD-Derivate **24** und **27**

In Tabelle 4 sind die spektroskopischen Eigenschaften des flexiblen (**24**) und des starren DBD-Bausteins (**27**) aufgelistet. Verbindung **24** wurde bereits hinreichend von R. WAWRZINEK untersucht und wird hier nur mit einer kleinen Auswahl an Lösungsmitteln dargestellt. Die Fluoreszenzeigenschaften der beiden Fluorophore unterscheiden sich kaum. Lediglich der Extinktionskoeffizient von **27** in DMSO ist mehr als die Hälfte kleiner als der von **24**.

Tabelle 4. Spektroskopische Eigenschaften der DBD-Fluorophore **24** und **27**

Verbindung	LSM	λ_{abs} / nm	λ_{em} / nm	$\Delta\lambda$	$\tau_{\text{F}}^{\text{c}}$ / ns	$\Phi_{\text{F}}^{\text{a}}$	ϵ / M ⁻¹ cm ⁻¹	$\Phi_{\text{F}} \cdot \epsilon$ / M ⁻¹ cm ⁻¹
24 	DCM	430	550	130	24.8 ^b	0.35 ^b	4300 ^b	1505
	DMSO	437	570	133	24.8	0.68	3958 ± 80	2691
	PBS ^a	448	612	164	6.2	0.01	-	-
	LUV ^a	448	612	122	7.0	0.01	-	-
27 	CHCl ₃	432	544	112	22.8	0.73	4607 ± 400	3363
	ACN	430	546	116	20.8	0.56	-	-
	Aceton	424	536	112	19.8	-	-	-
	DMSO	435	555	120	24.3	0.72	1571 ± 20	1131
	EtOH	434	580	146	13.5	-	-	-
	MeOH	440	597	157	7.7	0.15	-	-
	PBS ^a	448	612	164	6.4	0.01	-	-
	LUV ^a	448	612	164	7.0	0.01	-	-

^a vermessen von URSULA EISOLD, ^b der Literatur entnommen^[38], ^c $\lambda_{\text{exc}} = 447 \text{ nm}$; $\Delta\Phi_{\text{F}} = \pm 0.03$, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, LUV = large unilamellar vesicles

DBD-Farbstoffe zeigen eine Bande (π - π^* -Übergang) im kurzwelligen Absorptionsbereich (< 300 nm) mit einem großen Absorptionskoeffizienten und eine zweite Bande (n - π^* -Übergang) im langwelligeren Bereich (siehe λ_{abs}) mit einem sehr viel kleineren Absorptionskoeffizienten. Wie zu erwarten, sind die Fluoreszenzquantenausbeuten in PBS und LUV sehr klein (0.01). Die Fluoreszenzlebensdauern hingegen bieten in PBS als auch in den Vesikeln mit 6 ns - 7 ns eine gute Grundlage für Untersuchungen in biologischen Systemen und können mit gängigen Fluorophoren wie Rhodamin-, Fluorescein- oder BODIPY-Derivate mithalten. Der STOKES-Shift ist durch die langwellige λ_{em} mit 164 nm besonders groß.

4.1.5 FRET-Paar Testsystem

Dass ein FRET zwischen den dargestellten Coumarinen (Cou) und dem Acyl-DBD-Fluorophor prinzipiell möglich ist, beweist die Graphik in Abbildung 55. Dargestellt sind die Absorptions- und Emissionsspektren von Cou **12** (blau) und DBD-Fluorophor **24** (rot). Um einen FRET zu generieren, muss, wie in Kapitel 3.2.3 diskutiert, die Emissionsbande des Donors (Coumarin) mit der Absorptionsbande des Akzeptors (DBD) überlappen. Der orange-markierte Überlapp beider Banden ist sichtlich sehr groß und nimmt den größten Bereich der Banden ein.

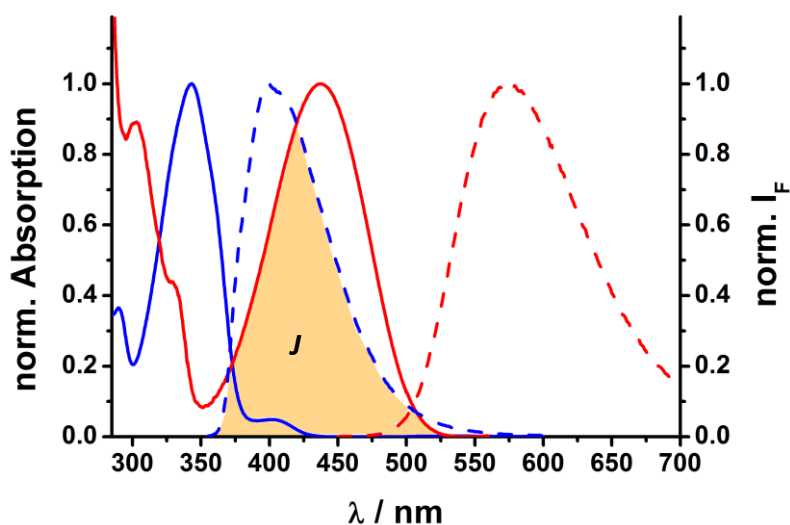


Abbildung 55. Überlapp *J* (orange Markierung) zwischen Cou **12** (blau) und DBD **24** (rot). Dargestellt sind die Absorptions- (durchgezogene Linie) und Emissionsspektren (gestrichelte Linie) in DMSO, I_F = Fluoreszenzintensität.

4.1.6 Synthese eines FRET-Paar Testsystems

Um ein erstes FRET-Modellsystem darzustellen, wurde das FRET-Paar **64**, mit einem kurzen und flexiblen Linker, synthetisiert (Abbildung 56). Das Coumarin **12** wurde mittels Pd/C in H_2 hydriert und anschließend mit dem mono-Boc-geschützten Diamin **60** verknüpft. Die Boc-Schutzgruppe wurde quantitativ mit TFA abgespalten. Verbindung **64** wurde über die Kupplung mit HOBt/DCC und der

DBD-Säure **24** in einer Ausbeute von 67% hergestellt. Die Ausbeute konnte noch gesteigert werden, in dem **62** mit dem direkt zuvor hergestellten Säurechlorid **63** umgesetzt wurde. Ausgehend von den Ausgangsverbindungen Coumarin **8** und Sesamol (**28**) konnte **64** über 11 Stufen mit einer Ausbeute von 39% erhalten werden.

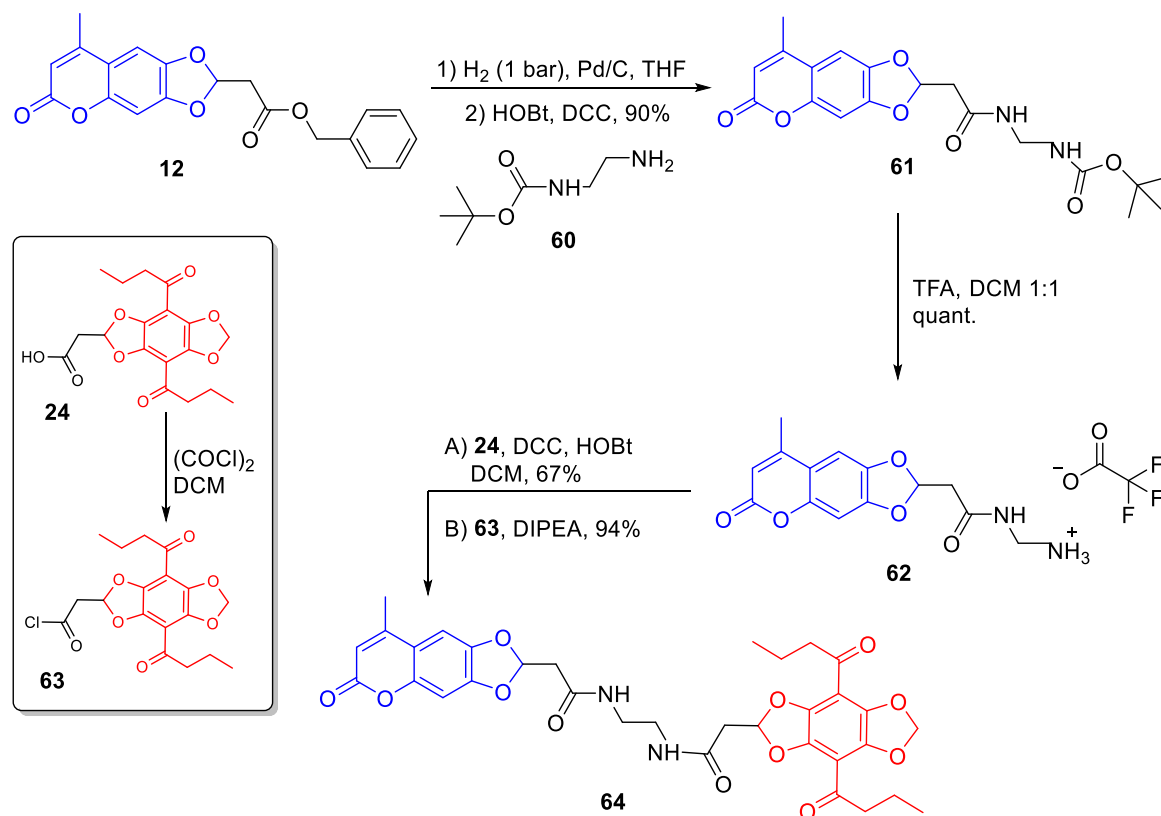
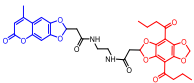


Abbildung 56. Synthese des FRET-Paares **64**.

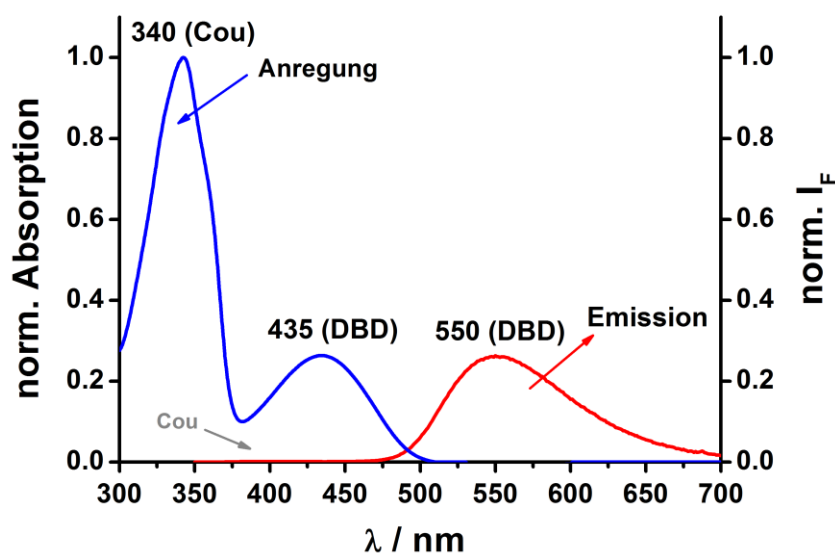
4.1.7 Spektroskopische Eigenschaften des FRET-Paares **64**

In Tabelle 5 sind die spektroskopischen Eigenschaften des FRET-Paares **64** in verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt. Zur leichteren Verständlichkeit erhalten die folgenden Fluoreszenz-(Stab)-Modelle eine Kurzbezeichnung, die in der Tabelle zu finden ist. Verbindung **64** wird z.B. als **Cou-f-DBD** bezeichnet, wobei das „f“ für flexibel steht. Die Anregungswellenlänge (λ_{exc}) der Emissionsspektren von **64** entspricht der λ_{abs} des Donors ($\lambda_{\text{abs,D}}$). In allen Lösungsmitteln findet ein sehr effizienter FRET, unter starkem Quenching der Donoremission, statt. Die hohe FRET-Effizienz ist vor allem an der Quantenausbeute des Donors ($\phi_{\text{F,D}}$) erkennbar, die maximal 0.03 beträgt. Besonders hervorzuheben ist die Fluoreszenzlebensdauer in Wasser, die mit 4.6 ns bemerkenswert hoch ist im Gegensatz zur Fluoreszenzlebensdauer des DBD-Fluorophors **24** in Wasser (1.5 ns). In PBS und LUV wurden für den Donor ausschließlich biexponentielle Fluoreszenzlebensdauern gemessen. Des Weiteren sind in PBS und LUV die Emissionsmaxima des Akzeptors stark hypsochrom (von 612 nm (**24**) zu 580 nm bzw. 542 nm) verschoben.

Tabelle 5. Spektroskopische Eigenschaften des FRET-Paares **64**

Verbindung	LSM	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{a}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{a,b}}$	$\tau_{\text{F}}^{\text{c}}$	$\phi_{\text{F}}^{\text{d}}$
		/ nm	/ nm	/ ns	
64 Cou-f-DBD 	CHCl ₃	343, 435	403, 560	25.7 (A)	0.01 (D), 0.40 (A)
	DCM	340, 435	-, 550	26.1 (A)	-
	DCE	343, 434	401, 550	25.7 (A)	-
	Aceton	-, 426	409, 555	23.1 (A)	0.005 (D), 0.55 (A)
	DMSO	344, 433	407, 570	24.3 (A)	0.01 (D), 0.70 (A)
	ACN	340, 431	406, 559	22.6 (A)	-
	tBuOH	340, 440	406, 576	21.1 (A)	-
	iPropanol	340, 436	406, 580	17.8 (A)	-
	EtOH	340, 434	409, 583	13.4 (A)	-
	MeOH	342, 437	406, 595	7.2 (A)	-
	H ₂ O	340, 450	410, 603	4.6 (A)	-
	PBS ^d	346, 456	413, 580	<0.1 (76%) (D) 3.6 (24%) (D)	-
	LUV ^d	346, 436	400, 542	<0.1 (88%) (D) 3.4 (12%) (D) 10.4 (A)	0.03 (D) 0.35 (A)

^a $\Delta\lambda = \pm 2\text{nm}$; ^b $\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{abs,D}}$; ^c $\lambda_{\text{exc}} = 372\text{ nm}$, $\Delta\tau_{\text{F,Cou}} = 0.1$, $\Delta\tau_{\text{F,DBD}} = 0.1$, D = Donor, A = Akzeptor, ^d vermessen von URSULA EISOLD, $\lambda_{\text{exc}} = 372\text{ nm}$, $\Delta\phi_{\text{F,D}} = \pm 0.003$, $\Delta\phi_{\text{F,A}} = \pm 0.03$, LUV = large unilamellar vesicles

**Abbildung 57.** Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot, $\lambda_{\text{exc}} = 340\text{ nm}$) von **64** in DCM.

Vergleicht man PBS und LUV von **64** miteinander, so fällt auch hier die hypsochrome Verschiebung von PBS (580 nm) zum LUV (542 nm) auf, die nicht nur in der Akzeptoremission sondern auch in der Donoremission (413 nm (PBS) → 400 nm (LUV)) auftritt. Dies könnte auf eine vollständige Einlagerung von **64** in die Phospholipidmembran hinweisen. Dieser Ansatz könnte nachfolgend über Fluoreszenzanisotropiemessungen verifiziert werden.

Die hohe FRET-Effizienz ist im Emissionsspektrum von **64** in Abbildung 57 sehr gut zu erkennen, da die Coumarinemission nur noch zu erahnen ist. Dies wird auch in den 3D-Fluoreszenzspektren in Abbildung 58 deutlich. Hier sind die Anregungs-Emissions-Spektren des Donors **12** (A), des Akzeptors **24** (B) und des FRET-Paares **64** (C) in DCM dargestellt. Wie im Bild C zu erkennen ist, findet keine sichtbare Emission des Donors statt.

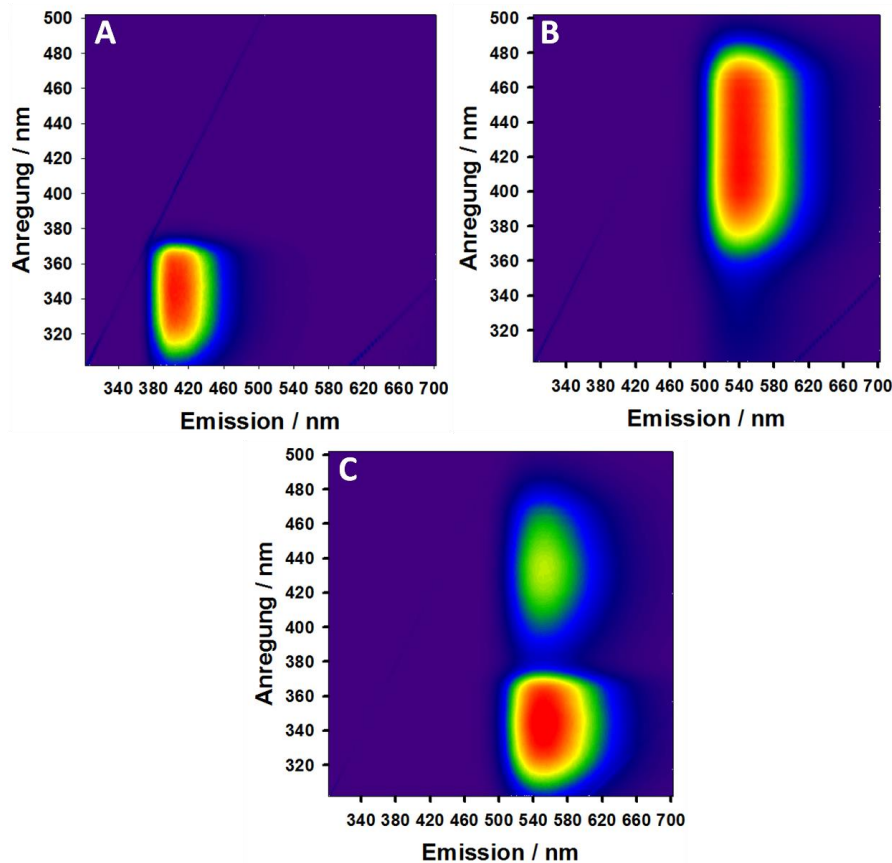


Abbildung 58. 3D-Anregungs-Emissions-Spektren von A: Coumarin **12**, B: DBD **24** und C: FRET-Paar **64** in DCM.

Die hohe FRET-Effizienz lässt sich aufgrund des geringen (maximalen) Abstands zwischen den Fluorophoren erklären. Dieser ist mit 1.5 - 1.6 nm sehr weit unter dem Förster-Abstand R_0 für dieses FRET-Paar. R_0 wurde für verschiedene Lösungsmittel nach Gleichung 3.19 berechnet und ist in Tabelle 6 aufgeführt. Der Förster-Abstand R_0 nimmt hier mit steigender Polarität des Lösungsmittels zu.

Tabelle 6. FRET-Parameter von **64**

Cou-f-DBD 64			
$\kappa^2 = 2/3$, Abstand D-A = 1.5 nm			
	J / cm^6	R_0 / nm	$E_{\text{FRET, theor.}}$
DCM	$9.5 \cdot 10^{-15}$	2.30	0.92
DMSO	$9.2 \cdot 10^{-15}$	2.52	0.96
PBS	$4.5 \cdot 10^{-15}$	3.30	0.99

$n_{\text{D, DCM}} = 1.4242$, $n_{\text{D, DMSO}} = 1.4793$, $n_{\text{D, PBS}} = 1.33$

Die FRET-Effizienzen wurden mit der freien Software PhotochemCAD™ berechnet.^[153]

4.1.8 Synthese der einfach-markierten OSK-Stäbe

Zur Darstellung erster Referenzstäbe sollten zunächst mono-funktionalisierte OSK-Stäbe synthetisiert werden. Dadurch lassen sich der Einfluss des Stabes auf die Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Fluorophore und der Einbau in die Vesikel leichter beurteilen. DBD und Coumarin sollten sowohl flexibel als auch starr gebunden sein, um die Fluoreszenzeigenschaften auf Unterscheidungen hin zu untersuchen. Verbindung **9** wurde dementsprechend mit dem Stab-Baustein **65a** bzw. **65b** über NOYORI (A), als auch über die Doppelaktivierungsmethode (B), acetalisiert (Abbildung 59).

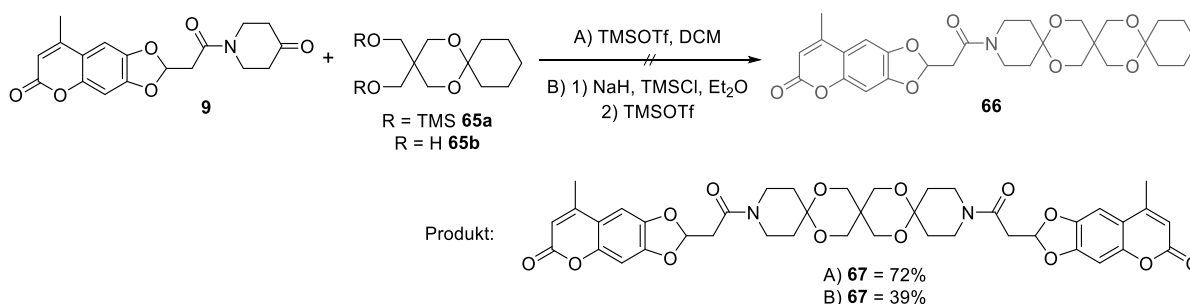


Abbildung 59. Synthese des Mono- Coumarin-Stabs **66** über A: NOYORI-Acetalisierung und B: Doppelaktivierung.

In beiden Fällen entstanden eine Reihe von Nebenprodukten, was die Reinigung sehr erschwerte. Der gewünschte flexible Coumarin-Stab **66** konnte nicht erhalten werden. Stattdessen wurde aufgrund von Umacetalisierungen der symmetrische, zweifach-markierte Stab **67** als Hauptprodukt gewonnen. Da symmetrische OSK-Stäbe sehr viel unlöslicher sind als asymmetrische, fallen diese nach ihrer Bildung meist sofort aus und werden der Reaktion entzogen. Das gleiche Phänomen wurde für den starren Coumarin-OSK-Stab **68** beobachtet. Hier wurde der zweifach-markierte Coumarin-Stab **69** mit einer Ausbeute von 83% erhalten. Obwohl Umacetalisierungen über die Doppel-

aktivierungsmethode größtenteils umgangen werden können, scheint die Bildung der symmetrischen Stäbe in diesem Fall bevorzugt zu sein.

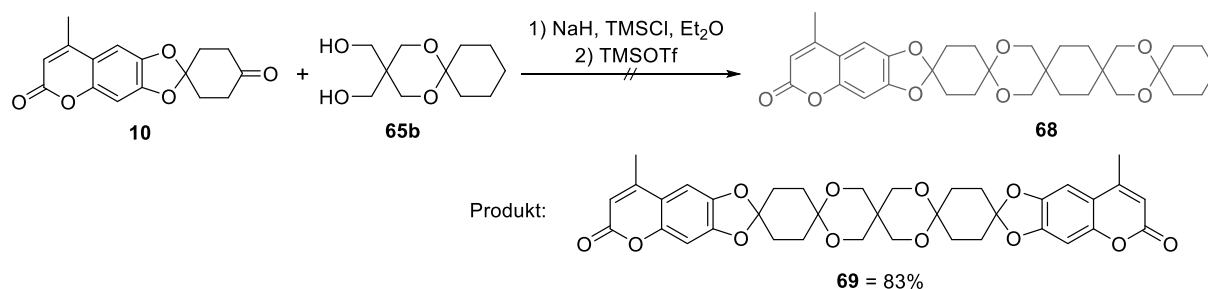


Abbildung 60. Synthese des Mono-Coumarin-OSK-Stabs **68** über Doppelaktivierung.

Verbindung **65b** wurde über eine bekannte Syntheseroute (Standardacetalisierung) synthetisiert (Abbildung 61).^[63,138] Das Silan **65a** konnte nach Silylierung quantitativ erhalten werden.

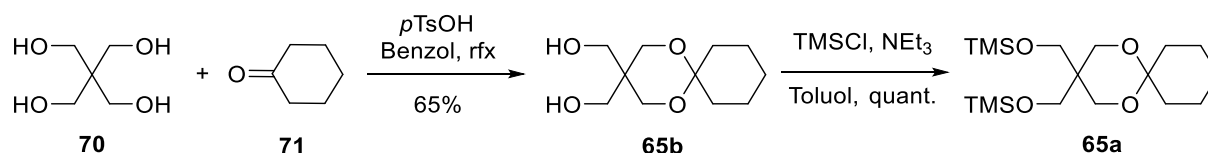


Abbildung 61. Synthese des Diols **65b** und des Silans **65a**.

Um dennoch die gewünschten OSK-Stäbe herzustellen und Umacetalisierungen zu verhindern, kann der Abstandshalter auch über Thioketal-Einheiten aufgebaut werden. Die Bildung von Thioketalen ist, im Gegensatz zu O-Ketalen, irreversibel. Die Synthese wird im folgenden Kapitel beschrieben.

4.1.9 Synthese der einfach-markierten OSTK-Stäbe

Da reine Thioketal-Stäbe zum Teil sehr unlöslich in gängigen Lösungsmitteln sind, wurden ausschließlich gemischte OSTK-Stäbe synthetisiert. Des Weiteren bieten sie den Vorteil, dass sie asymmetrisch funktionalisiert werden können, was für die geplanten Sensor-Stäbe unabdingbar ist. Des Weiteren stellt der Aufbau von asymmetrischen, reinen Thioketal-Stäben bisher noch ein großes Problem dar.^[60,78] Ausgehend von **72** wurde das Dithiol **74** über zwei Stufen in 60% hergestellt (Abbildung 62). Durch die selektive Schützung der Alkohole mit TBDMS und anschließender Acetalisierung mit Iod lässt sich das einseitig-acetalisierte Diol **2** darstellen. Die Synthesesequenz wurde von P. BRUHNS und M. GERNGROß entwickelt.^[60] Die Umsetzung zum Silan **76** verläuft quantitativ und macht Folge-Acetalisierungen über NOYORI möglich. Thioacetalisierungen erfolgen ähnlich zu O-Acetalisierungen über Thiole und Ketone oder Aldehyde die mit BRØNSTED- oder LEWIS-Säuren katalysiert werden. Typische Katalysatoren sind Iod^[154], $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ^[155], $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ^[156], TiCl_4 ^[157] oder *p*TsOH.

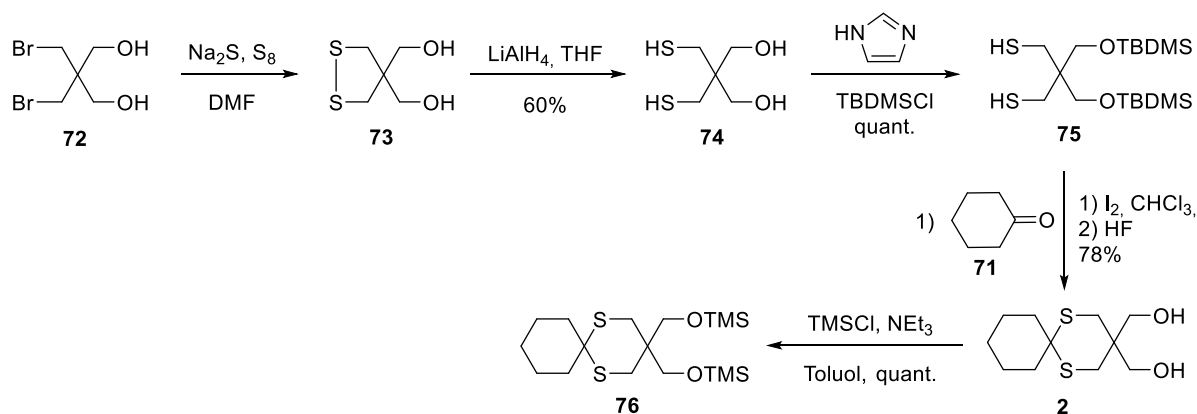


Abbildung 62. Synthese der Stab-Endstücke **2** und **76**.

Einige Katalysatoren müssen jedoch unter hohen Temperaturen eingesetzt werden. Der Standardkatalysator $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ kann zwar bei Raumtemperatur eingesetzt werden, wird aber in stöchiometrischen Mengen verwendet. Als besonders geeignet hat sich, im Zusammenhang mit OSTK-Stäben, Iod erwiesen. Er wird bei Raumtemperatur in katalytischen Mengen (5-10%) eingesetzt und benötigt nur kurze Reaktionszeiten.^[60]

Die Coumarine **9** und **10** wurden mit dem Diol **2** erfolgreich über die Doppelaktivierungsmethode zu den jeweiligen mono-funktionalisierten OSTK-Stäben **77** und **78** umgesetzt (Abbildung 63). Beide Stäbe lassen sich sehr gut in gängigen Lösungsmitteln (DCM, EE, MeOH usw.) lösen.

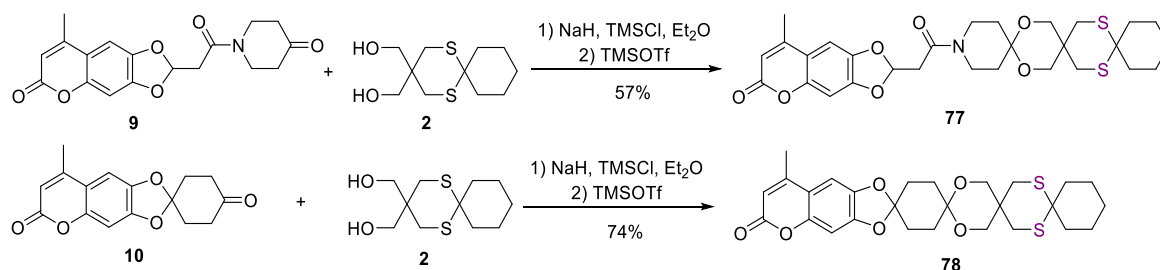


Abbildung 63. Synthese der Mono-Cou-OSTK-Stäbe **77** und **78**.

Die analogen DBD-OSTK-Stäbe **79** und **80** wurden ausgehend von **26** bzw. **27** und dem Silan **76** über NOYORI-Bedingungen in höheren Ausbeuten gewonnen (Abbildung 64). Auch diese beiden Stäbe lassen sich gut in gängigen Lösungsmitteln (DCM, EE, MeOH usw.) lösen. Für **77** und **78** könnten die Ausbeuten vielleicht auch über eine NOYORI-Acetalisierung vergrößert werden, da sich die Coumarine besser im Lösungsmittel (DCM) lösen.

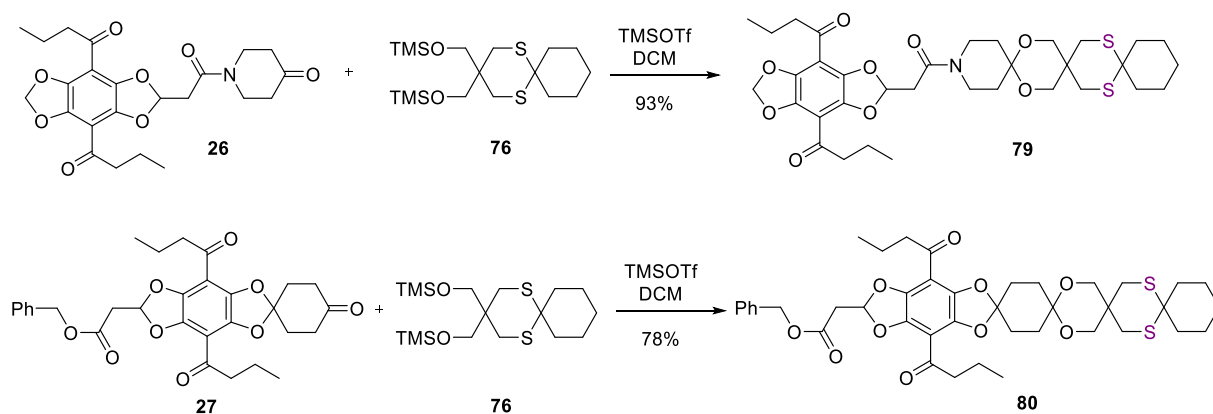


Abbildung 64. Synthese der Mono-DBD-OSTK-Stäbe **79** und **80**.

4.1.10 Synthese der doppelt-markierten OSTK-Stäbe

Im Rahmen der doppelt-markierten OSTK-Stäbe sollten sowohl ein „flexibler“ Stab, an dem mindestens ein Fluorophor frei drehbar ist, als auch ein „starrer“ Stab, an dem beide Fluorophore starr gebunden sind, synthetisiert werden. Der Acetalisierung von **9** mit dem Dithiol **75** und dem Katalysator Iod folgte anschließend die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe mittels HF. Die Reaktion ergab eine Vielzahl an Nebenprodukten, weshalb sich das Diol **81** nicht isolieren ließ (Abbildung 65).

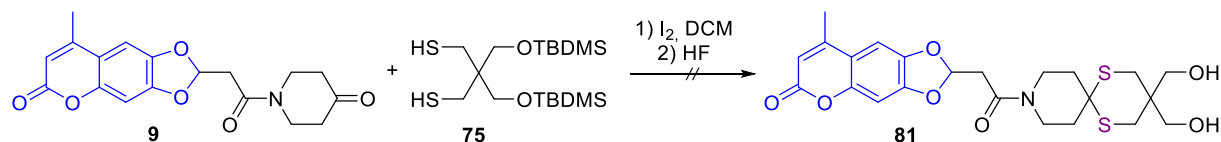


Abbildung 65. Synthese des flexiblen Cou-Stabbausteins **81**.

Das starre Coumarin-Diol **82** konnte hingegen mit einer guten Ausbeute von 87%, unter gleichen Reaktionsbedingungen, erhalten werden (Abbildung 66). Die Darstellung des Silans **83** verlief quantitativ.

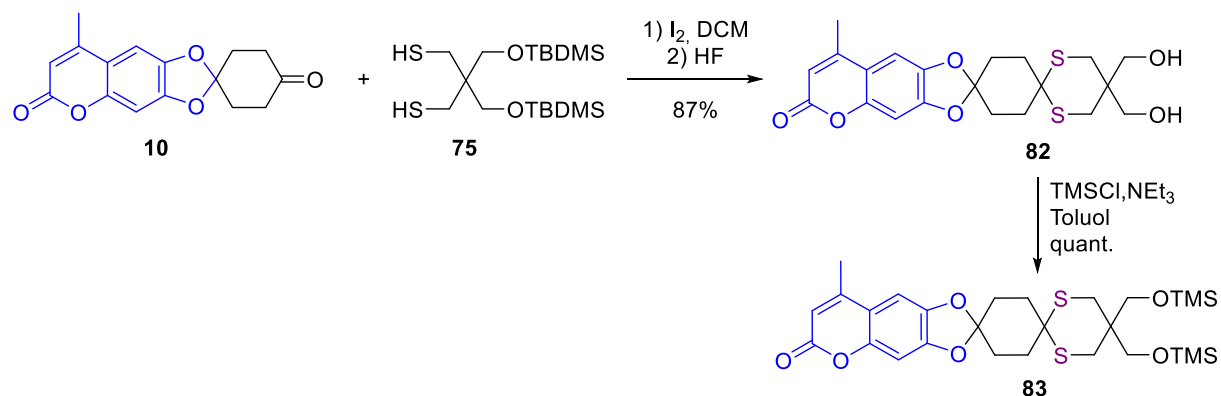


Abbildung 66. Synthese des starren Coumarin-Stabbausteins **83**.

Die Synthese des flexiblen Sensor-OSTK-Stabs **84** konnte daraufhin erfolgreich mit einer Ausbeute von 50% realisiert werden (Abbildung 67). Dafür wurden das Silan **83** und das DBD-Keton **26** nach NOYORI acetalisiert. Bei der Synthese wurden keine weiteren Nebenprodukte erhalten und die nicht-umgesetzten Edukte konnten wiedergewonnen werden. Eine höhere Ausbeute konnte durch Verlängerung der Reaktionszeit nicht erzielt werden, stattdessen entstanden undefinierbare Nebenprodukte, die wahrscheinlich auf eine Zersetzung des DBD-Fluorophors zurückzuführen sind. Verbindung **84** konnte insgesamt über 18 Stufen mit einer Ausbeute von 7% erhalten werden.

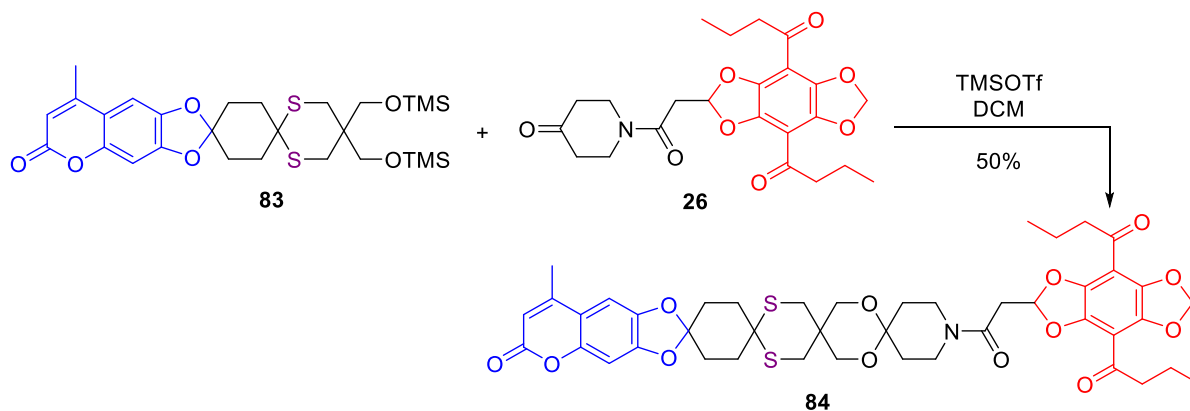


Abbildung 67. Synthese des FRET-Stabs **84**.

Gleichfalls konnte der starre doppelt-markierte OSTK-Stab **85** mit einer Ausbeute von 64% gewonnen werden.

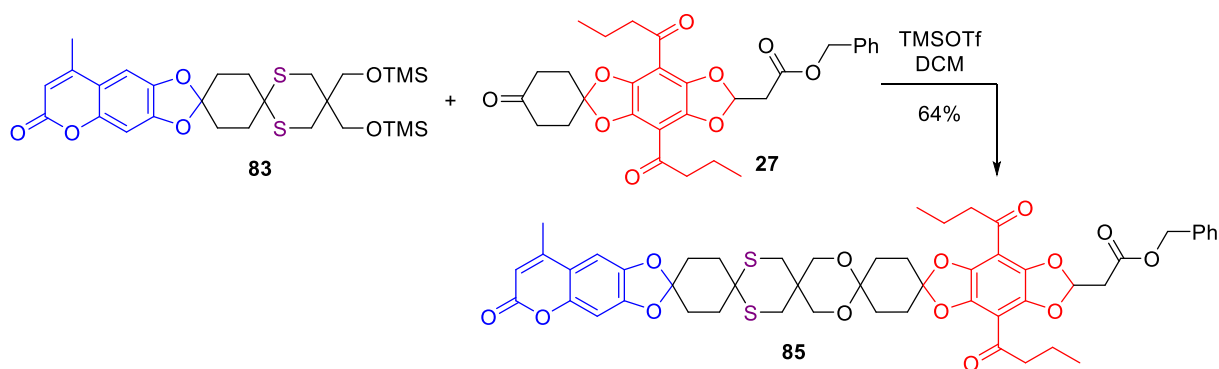


Abbildung 68. Darstellung des starren FRET-Stabes **85**.

Verbindung **85** wurde über 20 Stufen mit einer Ausbeute von 6% erhalten. Verbindung **84** als auch **85** lassen sich gut in gängigen Lösungsmittel (DCM, EE, MeOH usw.) lösen.

4.1.11 Spektroskopische Eigenschaften der OSTK-Stäbe

Im Folgenden werden zunächst die spektroskopischen Eigenschaften der einfach-markierten Stäbe dargestellt und diskutiert und anschließend die der doppelt-markierten Stäbe.

Einfach-markierte OSTK-Stäbe

In Tabelle 7 sind die mono-funktionalisierten Stäbe Cou-f-OSTK **77**, Cou-OSTK **78**, DBD-f-OSTK **79** und DBD-OSTK **80** und zum Vergleich die Edukte Cou **19** und DBD **27** dargestellt. Vergleicht man die spektroskopischen Eigenschaften der reinen Fluorophore Cou **19** und DBD **27** mit ihren entsprechenden funktionalisierten Stäben, so fällt auf, dass der Einsatz von Schwefel keinen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften ausübt. Die Absorptions- und Emissionsspektren sowie die Fluoreszenzlebensdauern und –quantenausbeuten der Coumarin-Stäbe Cou-f-OSTK **77** und Cou-OSTK **78** unterscheiden sich für die gängigen Lösungsmittel und zum Teil auch für PBS nicht wesentlich von ihren Edukten **19** oder **12**. Lediglich die Quantenausbeute von Cou-OSTK **78** in PBS sinkt etwa um die Hälfte im Gegensatz zu Cou **19**. In Abbildung 69 sind die Absorptions- und Emissionsspektren von **19** und **78** in PBS dargestellt.

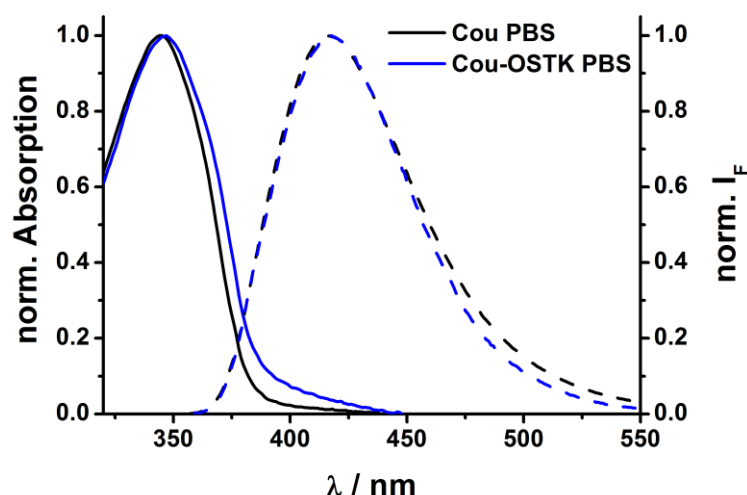
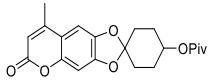
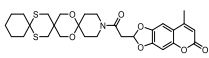
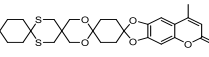
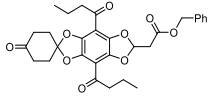
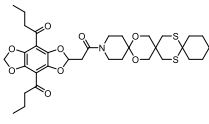
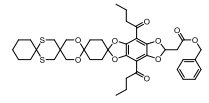


Abbildung 69. Absorptions- und Emissionsspektren (gestrichelte Linie) von Cou **19** (schwarz) und Cou-OSTK **78** (blau) in PBS, vermessen von URSULA EISOLD.

Größere Abweichungen zeigen sich, wie erwartet, wenn PBS mit LUV und LUV mit LUV miteinander verglichen werden. Die Fluoreszenzlebenszeit ist für Cou **19** und Cou-OSTK **78** im LUV kleiner als in PBS ($\Delta\tau_f \leq 0.7$ ns). Der Effekt ist bei Cou-OSTK **78** sogar noch ausgeprägter als beim reinen Coumarin **19**, wie in Abbildung 70 zu erkennen ist. Dies lässt vermuten, dass sich das Coumarin an der Grenzfläche zur Lipiddoppelschicht aufhält. Durch die sehr wahrscheinliche Einlagerung des unpolaren OSTK-Stabs von Cou-OSTK **78** befindet sich der wesentlich polarere Coumarin-Teil zwar ebenfalls an der Grenzschicht, liegt aber durch die starre Konformation des Stabs näher an/in der Lipiddoppelschicht

bzw. im unpolaren Bereich als **19**. Die daraus resultierende veränderte Stabilisierung der elektronischen Zustände führt zu einer Verringerung der Fluoreszenzabklingzeit.

Tabelle 7. Spektroskopische Eigenschaften der einfach-markierten Stäbe Cou-f-OSTK **77**, Cou-OSTK **78**, DBD-f-OSTK **79** und DBD-OSTK **80**

Verbindung	LSM	λ_{abs}^b / nm	λ_{em}^b / nm	$\Delta\lambda$ / nm	τ_F^c / ns	ϕ_F^d	ϵ / $M^{-1}cm^{-1}$
19 Cou 	PBS ^a	344	416	72	4.1	0.58	-
	LUV ^a	344	414	70	3.8	0.64	-
77 Cou-f-OSTK 	CHCl ₃	344	400	56	0.9	0.21	-
	ACN	342	410	68	0.7	0.13	-
	Aceton ^a	347	410	63	0.8	0.11	-
	PBS ^a	345	418	73	4.1	0.18	-
78 Cou-OSTK 	CHCl ₃	347	400	53	1.7	0.27	12300 ± 620 ^e
	ACN	342	410	68	0.8	0.16	-
	Aceton ^a	346	410	64	0.8	0.12	9240 ± 460 ^e
	PBS ^a	346	417	71	4.1	0.34	-
	LUV ^a	346	408	62	3.4	0.71	-
27 DBD 	PBS ^a	448	612	164	6.4	0.01	
	LUV ^a	448	612	164	7.0	0.01	
79 DBD-f-OSTK 	CHCl ₃	432	550	118	24.1	0.65	2320 ± 120 ^f
	ACN	430	555	125	20.9	0.52	-
	Aceton ^a	419	536	117	22.5	0.54	1950 ± 100 ^f
	PBS ^a	437	565	128	1.4 (77%) 4.9 (23%)	0.04	-
	LUV ^a	440	570	130	8.2	0.17	-
80 DBD-OSTK 	CHCl ₃	436	550	114	22.5	0.67	-
	Aceton ^a	-	-	-	19.3	-	-
	ACN	430	555	125	20.3	0.59	-
	PBS ^a	441	555	114	7.3	0.04	-
	LUV ^a	434	558	124	11.1	0.32	-

^a vermessen von URSULA EISOLD, ^b $\Delta\lambda = \pm 2$, ^c $\lambda_{\text{exc,Cou}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{exc,DBD}} = 447$ nm, $\Delta\tau_F = \pm 0.1$,

^d $\Delta\phi_{F,Cou} = \pm 0.04$, $\Delta\phi_{F,DBD} = \pm 0.04$, ^e $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm, ^f $\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm, LUV = large unilamellar vesicles

Ein weiteres Indiz für die Einlagerung von **78** in die Membran ist die leicht hypsochrom-verschobene Emissionswellenlänge zwischen PBS (417 nm) und LUV (408 nm), die ebenfalls in Abbildung 70 dargestellt ist. Interessanter Weise ist die Quantenausbeute jedoch mit 0.71 größer, als alle anderen Quan-

tenausbeuten der Coumarine. Befindet sich das Coumarin im unpolaren Bereich, müsste die Quantenausbeute eigentlich kleiner werden.

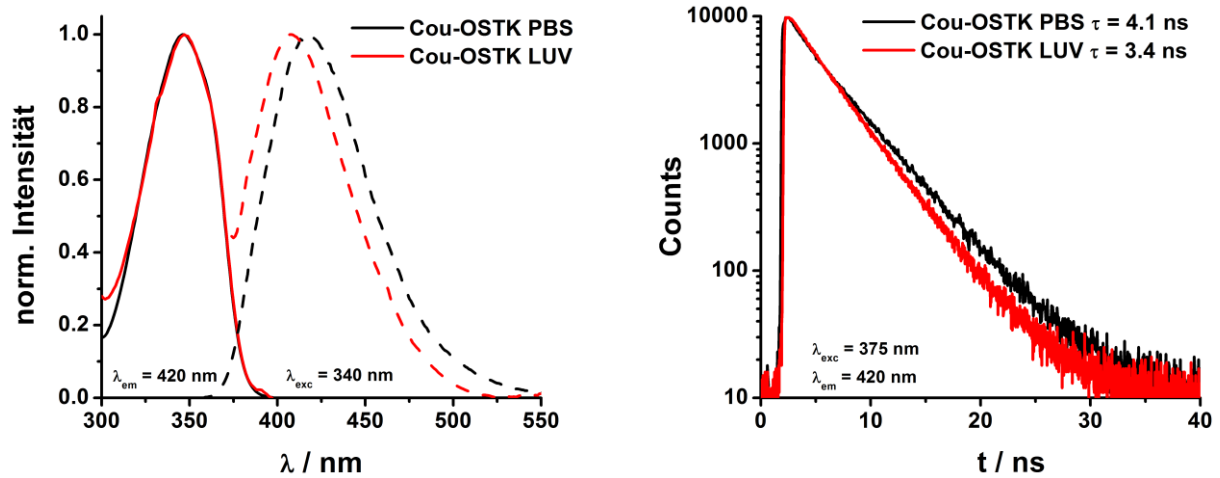


Abbildung 70. Fluoreszenzanregungs- ($\lambda_{em} = 420$ nm) und Emissionsspektren ($\lambda_{exc} = 340$ nm) von **78** in PBS (schwarz) und LUV (rot) und ihre Fluoreszenzabklingzeiten ($\lambda_{exc} = 375$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm), vermessen von URSULA EISOLD.

Im Falle der mono-markierten DBD-Stäbe DBD-f-OSTK **79** und DBD-OSTK **80**, unterscheiden sich die spektroskopischen Eigenschaften lediglich in PBS und LUV vom jeweiligen DBD-Fluorophor **27** bzw. **26**. Durch die Anbindung an den OSTK-Stab werden die Emissionsmaxima sehr stark hypsochrom ($\Delta\lambda \leq 57$ nm) verschoben, wohingegen für die Absorptionsmaxima nur ein geringer hypsochromer Effekt ($\Delta\lambda \leq 8$ nm) zu erkennen ist. Die Quantenausbeuten und Fluoreszenzabklingzeiten vergrößern sich. Vor allem in den Vesikeln steigen beide Parameter (τ_F , ϕ_F) stark an: $\tau_{F,80,LUV} = 11.1$ ns vs. $\tau_{F,27,LUV} = 7.0$ ns, $\Delta\tau_F = 4.1$ ns und $\phi_{F,80,LUV} = 0.32$ vs. $\phi_{F,27,LUV} = 0.01$, $\Delta\phi_F = 0.31$. Diese Änderungen deuten auf eine erfolgreiche Einlagerung der Stäbe in die unpolare Lipiddoppelschicht hin, wobei der Fluorophor sich auch hier eher an der Grenzschicht befindet. Der Unterschied zwischen starrer und flexibler Anbindung des Fluorophors hat ebenfalls einen bemerkenswerten Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften in den Vesikeln. Dies zeigt die wesentlich größere Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute von DBD-OSTK **80** ($\tau_{F,80,LUV} = 11.1$ ns, $\phi_{F,80,LUV} = 0.32$) im Gegensatz zu DBD-f-OSTK **79** ($\tau_{F,79,LUV} = 8.2$ ns, $\phi_{F,79,LUV} = 0.17$). Durch den flexiblen Verbinder ragt der Fluorophor von DBD-f-OSTK **79** vermutlich weiter aus der Lipiddoppelschicht heraus. Des Weiteren ist auch anzumerken, dass sich bei DBD-f-OSTK **79** in PBS, aufgrund der Anbindung an den OSTK-Stab, als einziges die Kinetik der Fluoreszenzlebensdauer ändert. In Abbildung 71 sind die Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren von DBD **27**, DBD-f-OSTK **79** und DBD-OSTK **80** in PBS sowie deren Fluoreszenzabklingzeiten dargestellt. Die Unterscheidungen in der λ_{em} und τ_F , aufgrund der Anbindung an den Stab, sind deutlich zu erkennen.

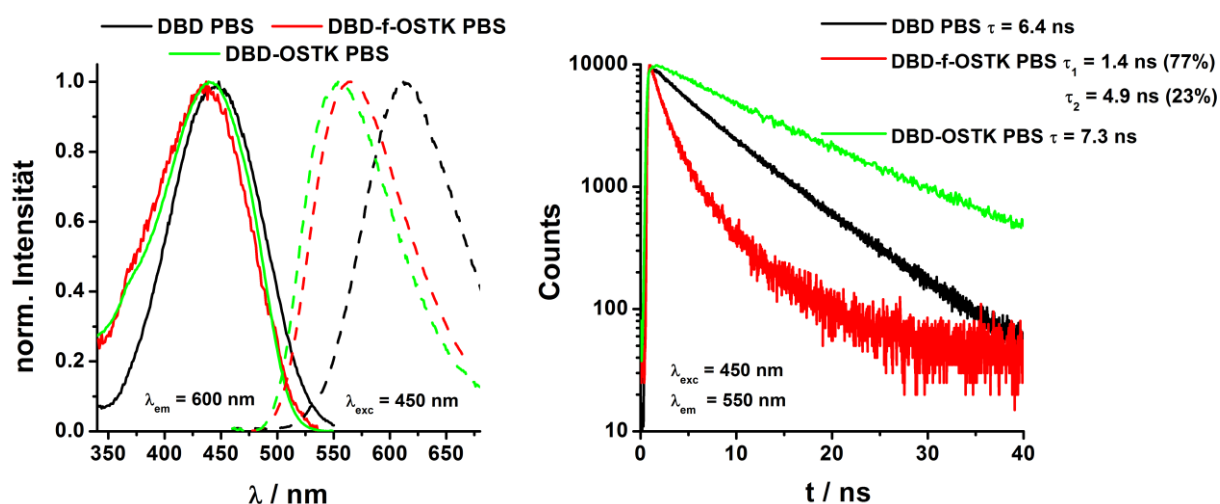


Abbildung 71. A: Fluoreszenzanregungs- ($\lambda_{em} = 600$ nm) und Emissionsspektren ($\lambda_{exc} = 450$ nm) von **27** (schwarz), DBD-f-OSTK (**79**, rot) und DBD-OSTK (**80**, grün) in PBS und ihre Fluoreszenzabklingzeiten (B, $\lambda_{exc} = 450$ nm, $\lambda_{em} = 550$ nm), vermessen von URSULA EISOLD.

Der erfolgreiche Einbau der Stäbe in die Vesikeln ist auch aus den Anisotropiemessungen in Tabelle 8 zu erkennen.

Tabelle 8. Anisotropieparameter für Cou **19**, Cou-OSTK **78**, DBD-f-OSTK **27**, DBD-f-OSTK **79** und DBD-f-OSTK **80**^a

Verbindung	LSM	r	r_{∞}	Φ / ns	θ_c / °
19	PBS	0 ± 0.02	0 ± 0.02	0.3 ± 0.1	-
	Cou	0 ± 0.02	0 ± 0.02	0.2 ± 0.1	-
78	PBS	0 ± 0.02	0 ± 0.02	0.3 ± 0.1	-
	Cou-OSTK	0.08 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.1	50 ± 5
27	PBS	0 ± 0.02	0 ± 0.02	0.1 ± 0.05	-
	DBD	0 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.2 ± 0.1	60 ± 5
79	PBS	0 ± 0.02	0 ± 0.02	0.1 ± 0.05	-
	DBD-f-OSTK	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.8 ± 0.1	55 ± 5
80	PBS	0 ± 0.02	0 ± 0.02	0.3 ± 0.1	-
	DBD-OSTK	0.09 ± 0.02	0 ± 0.02	0.2 ± 0.1	-

^a Die Werte in der Tabelle stammen von URSULA EISOLD.

Für die Coumarine Cou **19** und Cou-OSTK **78** zeigen die Anisotropiemessungen in PBS keine Unterscheidung in der molekularen Rotation ($r = 0$). Die relativ kleine Gesamtgröße der Stäbe erlaubt eine vollständige Depolarisation innerhalb der Fluoreszenzabklingzeit. Auch die zeitaufgelösten Depolarisationsmessungen ($\Phi = 0.3$) und die Grenzanisotropie ($r_{\infty} = 0$) zeigen keinen Unterschied. Vergleicht

man die Puffer-Lösung (PBS) mit den Vesikeln (LUV) bzw. die Vesikel-Messungen miteinander, so ist hier ein Unterschied zu erkennen. Die stationäre Anisotropie r ($\Delta r = 0.08$), als auch die Grenzanisotropie r_∞ ($\Delta r_\infty = 0.1$) nehmen im LUV für Cou-OSTK **78** zu. Aufgrund der detektierten limitierten Anisotropie r_∞ wird ein Kegelwinkel von etwa $\theta_c = 50^\circ$ erhalten. Die geringere Rotationsfreiheit von Cou-OSTK **78** ist hier eindeutig auf einen erfolgreichen Einbau in die hydrophobe Phospholipidmembran zurückzuführen. Die Rotationskorrelationszeit von Cou-OSTK **78** in LUV ($\Phi = 0.2$) ist sehr schnell und ähnlich der in PBS ($\Phi = 0.3$).

Auch im Falle der DBD-Stäbe DBD-f-OSTK **79** und DBD-OSTK **80** vergrößern sich die Werte der stationären Anisotropie r ($\Delta r \leq 0.09$) im LUV bezogen auf das Edukt **27**, wobei für alle DBD-Derivate in PBS keine Fluoreszenzanisotropie, aufgrund der schnellen Rotation der Moleküle in homogener Lösung, detektiert wurde. Eine limitierte Anisotropie r_∞ im Vesikel konnte sowohl für DBD **27** als auch für DBD-f-OSTK **79** gefunden werden, mit einem Kegelwinkel von etwa $\theta_{c,27} = 60^\circ$ bzw. $\theta_{c,79} = 55^\circ$. Für DBD-OSTK **80** konnte im Vesikel keine Grenzanisotropie ermittelt werden. Die Rotationskorrelationszeiten erhöhen sich teilweise für die DBD-Stäbe in LUV und PBS gegenüber DBD **27**. Insgesamt beweisen die Werte den erfolgreichen Einbau der DBD-Stäbe in die Membran der Vesikel.

Doppelt-markierte OSTK-Stäbe

In Tabelle 9 sind die spektroskopischen Eigenschaften der doppelt-markierten OSTK-Stäbe Cou-OSTK-DBD **85** und Cou-OSTK-f-DBD **84** aufgeführt.

Tabelle 9. Spektroskopische Eigenschaften der doppelt-markierten Stäbe Cou-OSTK-DBD **85** und Cou-OSTK-f-DBD **84**

Verbindung	LSM	λ_{abs}^b / nm	λ_{em}^b / nm	τ_{F}^c / ns	ϕ_{F}^d	ϵ^e / $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
85 Cou-OSTK- DBD	CHCl ₃ ^a	349, 440	400, 541	0.1 (93%)(D)	0.01 (D)	13600 ± 680 (D)
				1.8 (7%) (D)	0.71 (A)	3200 ± 160 (A)
				22.3 (A, DA)		
	DCM	344,433	400, 550	23.4 (A)	-	-
	Aceton ^a	346, 432	404, 531	0.1 (68%) (D)	0.01 (D)	9330 ± 470 (D)
				1.2 (32%) (D)	0.58 (A)	2840 ± 140 (A)
				18.9 (A, DA)		
	DMSO	344, 440	402, 562	25.0 (DA)	-	-
	ACN	343,432	409, 556	20.3 (DA)	-	-
	EtOH	345, 440	406, 588	13.6 (DA)	-	-
MeOH	345, 440	405, 597	7.9 (DA)	-	-	
PBS	346, 437	403, 569	<0.1 (92%) (D)	0.01 (D)	-	
			2.7 (8%) (D)	0.14 (A)		
			5.1 (A)			
LUV	346, 435	416, 551	<0.1 (56%) (D)	0.03 (D)	-	
			3.9 (44%) (D)	0.35 (A)		
84 Cou-OSTK-f- DBD	CHCl ₃	347, 434	405, 550	1.2 (D)	0.05 (D)	13900 ± 700 (D)
				22.5 (A, DA)	0.74 (A)	1855 ± 90 (A)
	DCM	346,432	403, 551	26.0 (A, DA)		-
	Aceton	346, 425	408, 549	0.5 (D)	0.02 (D)	9700 ± 490 (D)
				18.1 (DA)	0.60 (A)	1455 ± 70 (A)
	DMSO	345,434	415, 567	24.3 (A, DA)	-	-
	ACN	342, 428	410, 559	21.6 (DA)	-	-
	EtOH	345, 433	403, 593	11.3 (DA)	-	-
	PBS	346, 442	417, 570	0.6 (28%)(D)	0.04 (D)	-
				3.9 (72%) (D)	0.06 (A)	
			6.2 (A)			
LUV	346, 435	408, 558	0.4 (12%) (D)	0.08 (D)	-	
			3.0 (88%) (D)			

^a vermessen von URSULA EISOLD, ^b $\Delta\lambda = \pm 2$, ^c $\lambda_{\text{exc,D}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{exc,DA}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{exc,A}} = 450$ nm, $\Delta\tau_{\text{F}} = \pm 0.03$; D (Donor) bzw. A (Akzeptor) = gemessen bei $\lambda_{\text{em,D}}$ bzw. $\lambda_{\text{em,A}}$, DA = angeregt bei D und gemessen bei A, ^d $\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{abs,Cou}}$, $\Delta\phi_{\text{F,Cou}} = \pm 0.001$, $\Delta\phi_{\text{F,DBD}} = \pm 0.04$, ^e $\epsilon_{\text{Cou}}: \lambda = 340$ nm, $\epsilon_{\text{DBD}}: \lambda = 450$ nm, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung, LUV = large unilamellar vesicles

Die Absorptions- und Emissionswellenlängen von Cou-OSTK-DBD **85** und Cou-OSTK-f-DBD **84** sind für PBS und LUV, aufgrund der Anbindung an den OSTK-Stab, auf die gleiche Weise hypsochrom verschoben, wie ihre mono-markierten Analoga (**77/78** bzw. **79/80**). Für Cou-OSTK-f-DBD **84** verschiebt sich die λ_{em} für LUV bzgl. PBS ebenfalls hypsochrom, wodurch auch hier anzunehmen ist, dass der Stab in die Vesikelmembran eingebaut wurde. Die λ_{em} von Cou-OSTK-DBD **85** in PBS verschiebt sich hingegen bathochrom bzgl. PBS (siehe Abbildung 72), was entgegen der Theorie für einen Einbau in die Vesikelmembran spricht. Für die übrigen Lösungsmittel wurden keine nennenswerten Abweichungen von **84** und **85** zu ihren Fluorophor-Edukten detektiert ($\Delta\lambda = \pm 5$). Die Fluoreszenzlebensdauern wurden zum einen durch Anregung des Donors ($\lambda_{exc,D} = \lambda_{abs,D}$) für den Akzeptor bestimmt (DA, $\lambda_{em,A}$), zum anderen aber auch teilweise nur für den Donor (D, $\lambda_{exc,D} = \lambda_{abs,D}$) bzw. Akzeptor (A, $\lambda_{exc,A} = \lambda_{abs,A}$). Für Cou-OSTK-DBD **85** wurden in $CHCl_3$ und Aceton biexponentielle Donor-Fluoreszenzabklingzeiten gemessen. Da die Substanzen vor der Vermessung rein waren, ist die Existenz von ungebundenen Coumarin, was für die lange Lebensdauer verantwortlich sein könnte, theoretisch auszuschließen. Jedoch kann es durch die Lagerung zu Zersetzungsprozessen kommen, die für die langen Coumarin-Fluoreszenzabklingzeiten verantwortlich sein könnten. Sehr viel wahrscheinlicher ist jedoch eine Änderung der Abklingkinetik aufgrund der Anbindung an den OSTK-Stab. Auch in PBS und LUV wurden für Cou-OSTK-DBD **85** und Cou-OSTK-f-DBD **84** biexponentielle Fluoreszenzabklingzeiten detektiert. Gleiches wurde auch für Cou-f-DBD **64** beobachtet. In Abbildung 72 sind die Emissionsspektren und die Fluoreszenzabklingkurven ($\lambda_{em} \equiv$ Donor) von Cou-OSTK-DBD **85** in PBS und LUV dargestellt.

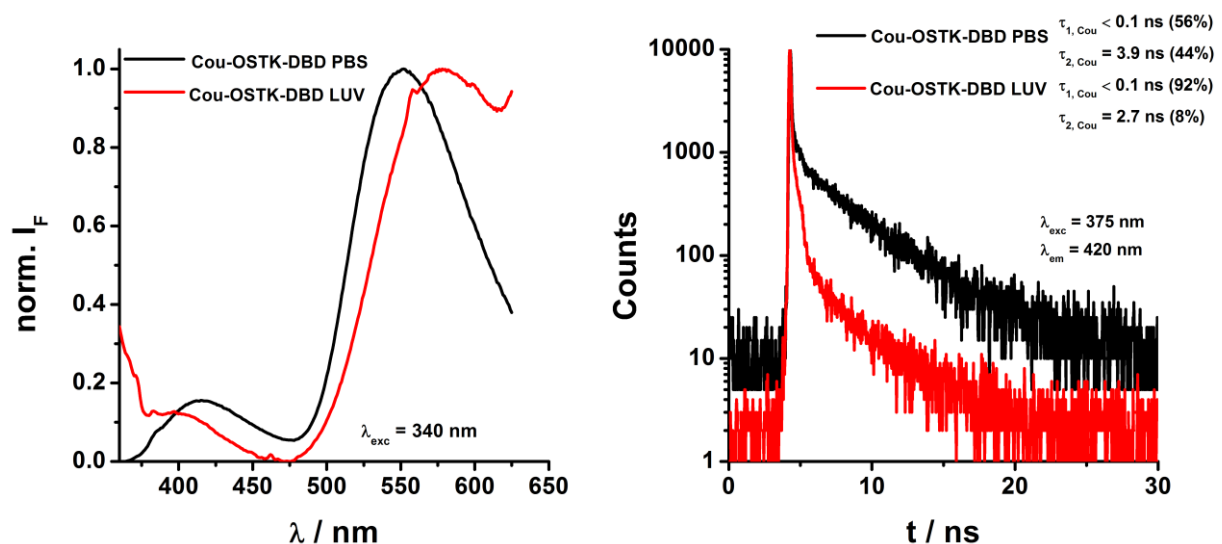


Abbildung 72. A: Emissionsspektren ($\lambda_{exc} = 340$ nm) und B: Fluoreszenzabklingkurven von ($\lambda_{exc} = 375$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm) von Cou-OSTK-DBD **85** in PBS (schwarz) und LUV (rot), vermessen von URSULA EISOLD.

Die Fluoreszenzabklingkurven bzw. -zeiten der Coumarinemission zeigen, dass die Fluoreszenzabklingzeit im LUV kleiner ist als in PBS, was wiederum zeigt, dass sich das Coumarin in einer unpolaren Umgebung aufhält. Demnach befindet es sich an der Grenzschicht zwischen Membran und PBS.

Ein Vergleich mit dem Coumarin **19** zeigt, dass die Donorquantenausbeuten von Cou-OSTK-DBD **85** und Cou-OSTK-f-DBD **84** mit $\phi_{F,D} \leq 0.08$ sehr stark reduziert sind und dementsprechend eine hohe FRET-Effizienz vorliegt. In Abbildung 73 ist das Absorptions- und Emissionsspektrum von Cou-OSTK-DBD **85** dargestellt. Im Gegensatz zu Cou-f-DBD **64** ist im Emissionsspektrum die verkleinerte Coumarinbande noch gut zu erkennen. Gleiches gilt auch für Cou-OSTK-f-DBD **84** (nicht abgebildet), weshalb die FRET-Effizienzen der starren Stäbe kleiner sind, als die für das sehr flexible FRET-Paar Cou-f-DBD **64**.

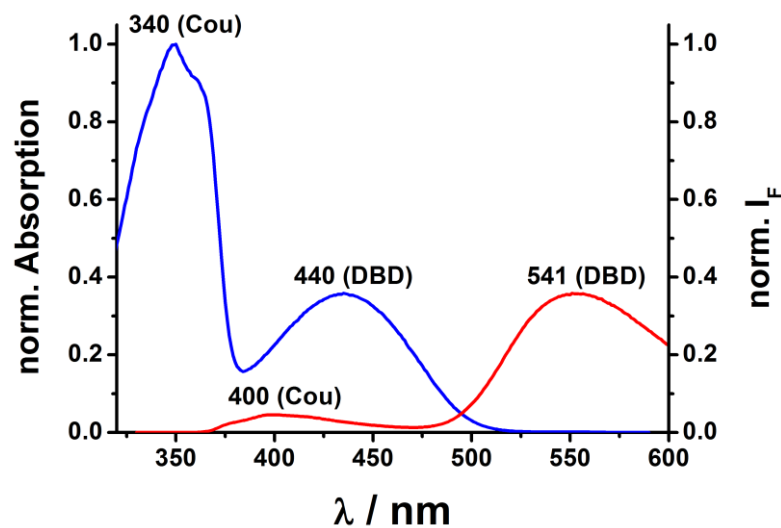


Abbildung 73. Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von Cou-OSTK-DBD **85** in CHCl_3 .

In Tabelle 10 sind die theoretisch berechneten FRET-Effizienzen für die beiden doppelt-markierten OSTK-Stäbe zusammengefasst.

Tabelle 10. FRET-Parameter von Cou-OSTK-f-DBD **84** und Cou-OSTK-DBD **85**

Cou-OSTK-f-DBD 84				Cou-OSTK-DBD 85			
$\kappa^2 = 2/3$, Abstand D-A = 2.2 nm				$\kappa^2 = 3.9$, Abstand D-A = 1.9 nm			
	J / cm^6	R_0 / nm	$E_{\text{FRET, theor.}}$		J / cm^6	R_0 / nm	$E_{\text{FRET, theor.}}$
DCM	$9.4 \cdot 10^{-15}$	2.56	0.71	-	-	-	-
DMSO	$9.3 \cdot 10^{-15}$	2.58	0.86	DMSO	$3.9 \cdot 10^{-15}$	2.99	0.94
PBS	$5.0 \cdot 10^{-15}$	3.20	0.90	PBS	$4.2 \cdot 10^{-15}$	4.10	0.99

$$n_{\text{D, DCM}} = 1.4242, n_{\text{D, DMSO}} = 1.4793, n_{\text{D, PBS}} = 1.33$$

Die theoretischen FRET-Effizienzen für Cou-OSTK-f-DBD **84** sind, aufgrund des kleineren κ^2 Wertes, kleiner, als die von Cou-OSTK-DBD **85**. Letzterer hat, aufgrund der starren Anbindung der Fluorophore Cou und DBD sowie deren annähernd kollinear zueinander stehenden Übergangsdipolmomenten (Abbildung 74), einen sehr hohen κ^2 -Wert von 3.9. Dadurch wird ein Försterabstand R_0 von 2.99 nm in DMSO und in PBS sogar von 4.1 nm erhalten. Da der Stab jedoch nur etwa 1.9 nm misst, werden FRET-Effizienzen von $> 90\%$ erreicht. R_0 kann in diesem Fall nur durch eine Stabverlängerung erreicht werden. Bei der Referenz-Verbindung Cou-OSTK-f-DBD **84** ist der DBD-Fluorophor, aufgrund des flexiblen Verbinders, frei drehbar, weshalb der κ^2 -Wert auf $2/3$ reduziert wird. Aufgrund dessen werden R_0 -Werte zwischen 2.56 nm (DCM) und 3.20 nm (PBS) erhalten. Ersteren erreicht der etwa 2.2 nm lange Cou-OSTK-f-DBD- Stab **84** annähernd, weshalb für DCM eine theoretische FRET-Effizienz von 71% besteht.

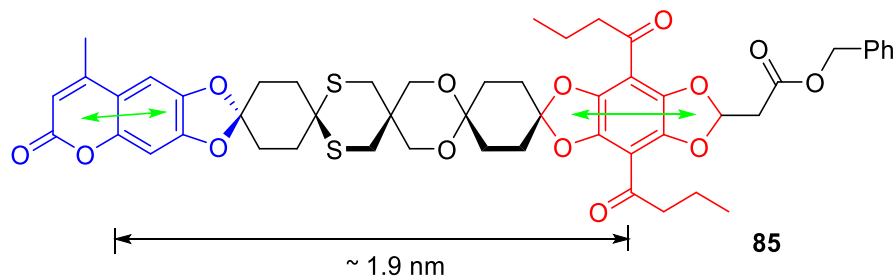


Abbildung 74. Cou-OSTK-DBD **85** und dessen Übergangsdipolmomente (grüne Pfeile).

Die experimentellen FRET-Effizienzen können nach Gleichung 4.1, aufbauend auf den Fluoreszenzabklingzeiten bzw. -quantenausbeuten, bestimmt werden. Gleichung 4.1 ergibt sich durch Umstellung von Gleichung 4.4 und einsetzen von Gleichung 4.2 und 4.3.

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{\phi_{\text{DA}}}{\phi_{\text{D}}} = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_{\text{D}}} \quad (4.1)$$

mit: $k_{\text{D}} = k_{\text{nr}} + k_{\text{r}} = \frac{1}{\tau_{\text{D}}}$ (4.2)

$$k_{\text{DA}} = k_{\text{nr}} + k_{\text{r}} + k_{\text{T}} = \frac{1}{\tau_{\text{DA}}} \quad (4.3)$$

$$E = \frac{k_{\text{T}}}{k_{\text{T}} + k_{\text{D}}} = \frac{k_{\text{T}} + k_{\text{D}} - k_{\text{D}}}{k_{\text{T}} + k_{\text{D}}} = 1 - \frac{k_{\text{D}}}{k_{\text{T}} + k_{\text{D}}} = 1 - \frac{k_{\text{D}}}{k_{\text{DA}}} = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_{\text{D}}} \quad (4.4)$$

Die entsprechenden experimentellen FRET-Effizienzen wurden für Cou-OSTK-DBD **85**, Cou-OSTK-f-DBD **84** als auch für Cou-f-DBD **64** berechnet und sind in Tabelle 11 aufgetragen. Im Falle des starren Stabes Cou-OSTK-DBD **85** sind die experimentellen FRET-Effizienzen überwiegend $> 90\%$. Sie harmonisieren gut mit den theoretischen Werten aus Tabelle 10. Für Cou-OSTK-f-DBD **84** wurden jedoch für CHCl_3 und Aceton sehr unterschiedliche Werte erhalten, die anscheinend unabhängig vom Lösungs-

mittel sind. Ein möglicher Grund dafür könnte die Bildung eines Gleichgewichtes zwischen zwei Konformeren sein. Wobei sich bei einem Konformer der DBD-Fluorophor näher zum OSTK-Stab neigt und sich dadurch zum einen der D-A-Abstand verringert und sich zum anderen die Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander ändert, wahrscheinlich aber reduziert wird (siehe Abbildung 75). Dies könnte zu einem kleineren R_0 führen und die geringen experimentellen FRET-Effizienzen erklären. Als zweites Konformer wäre die langgestreckte Form denkbar. Hier ist der Stab länger und κ^2 kann Werte von $> 2/3$ annehmen, wodurch ein effizienterer FRET vorhanden ist. Für die sehr effiziente Energieübertragung kann kaum eine Fluoreszenzabklingzeit bestimmt werden, wohingegen für die viel geringere Energieübertragung des geknickten Konformers eine reduzierte Fluoreszenzabklingzeit messbar ist.

Tabelle 11. FRET-Effizienzen von Cou-OSTK-DBD **85**, Cou-OSTK-f-DBD **84** und Cou-f-DBD **64**^a

Verbindung	LSM	$E_{\text{FRET}} (\phi_{\text{F}})$	$R_{0,\text{exp}} (\phi_{\text{F}}) / \text{nm}^{\text{b}}$	$E_{\text{FRET}} (\tau_{\text{F}})$	$R_{0,\text{exp}} (\tau_{\text{F}}) / \text{nm}^{\text{b}}$
85 Cou-OSTK-DBD	CHCl ₃	0.92 ± 0.01	-	0.88 ± 0.05	-
	Aceton	0.96 ± 0.01	-	0.95 ± 0.02	-
	PBS	0.97 ± 0.01	2.3	> 0.95 ± 0.01	<2.5
	LUV	0.96 ± 0.01	2.4	> 0.95 ± 0.01	<2.5
84 Cou-OSTK-f-DBD	CHCl ₃	0.83 ± 0.02	-	0.38 ± 0.2	-
	Aceton	0.81 ± 0.02	-	0.30 ± 0.1	-
	PBS	0.88 ± 0.01	2.3	0.85 ± 0.01	2.4
	LUV	0.88 ± 0.01	2.3	0.88 ± 0.01	2.3
64 Cou-f-DBD	PBS	0.93 ± 0.01	2.1	0.95 ± 0.01	<2.0
	LUV	0.95 ± 0.01	2.0	0.95 ± 0.01	<2.0

^a Die Werte in der Tabelle stammen von URSULA EISOLD, ^b $\Delta = \pm 0.15$

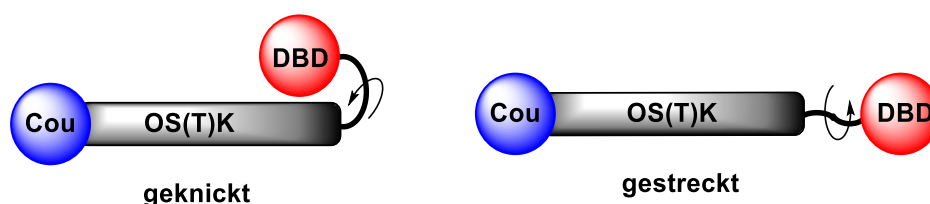


Abbildung 75. Schematische Darstellung eines geknickten und eines gestreckten Konformers von **84**.

Die experimentellen FRET-Effizienzen von Cou-f-DBD **64** stimmen sehr gut mit den theoretischen Werten ($E_{\text{FRET, theor., PBS}} = 0.99$) überein. Insgesamt konnten für die einzelnen FRET-Paare gute Übereinstimmungen zwischen den experimentellen und theoretischen FRET-Parametern in PBS und LUV ermittelt werden. Die Sensor-OSTK-Stäbe bieten, aufgrund ihrer Steifigkeit und Robustheit, ein gutes Modell für FRET-Sensoren. Um einen steifen FRET-OSTK-Stab tatsächlich für kraftbasierte FRET-

Untersuchung in Zellen nutzen zu können, bedarf es allerdings noch synthetischer Veränderungen (Länge) und vielfältiger spektroskopischer Untersuchungen. Zum einen muss z.B. der Einfluss von Molekülschwingungen auf die experimentell-bestimmte FRET-Effizienz näher untersucht werden. Dies könnte durch Erweiterung der Stablänge oder durch Integration von Gelenkeinheiten realisiert werden. Antworten könnten in diesem Zusammenhang Einzelmolekül-FRET-Experimente geben, die bisher noch nicht durchgeführt wurden.

Erste Bemühungen zur Verlängerung der Sensor-OSTK-Stäbe sind in den folgenden Kapiteln 4.1.12 und 4.1.14 dargestellt. Da mit wachsender Stablänge auch eine Verschlechterung der Löslichkeit einhergeht, wurden unter anderem OSTK-Gelenk-Stäbe synthetisiert und charakterisiert.

4.1.12 FRET-Gelenkstab

Die Synthese von langen OS(T)K-Stäben ist aufgrund ihrer abnehmenden Löslichkeit begrenzt. Der Einbau von löslichkeitsvermittelnden Muffen wurde im Arbeitskreis WESSIG bereits umfangreich untersucht. Die Synthese von asymmetrisch di-funktionalisierten OS(T)K-Stäben mit Muffen ist jedoch nicht trivial und bedarf noch reichlich Optimierung.^[42,55,60] Eine einfache Möglichkeit zur Verlängerung von Stäben stellen Gelenkstäbe dar, die noch eine gewisse Steifigkeit besitzen, sich durch das Gelenk jedoch der Umgebung anpassen können. Daraus resultieren interessante Eigenschaften für den Einbau in Membranen. Zunächst werden einfach-markierte Stäbe synthetisiert, die an einem Ende starr mit Cou bzw. DBD markiert sind. Das andere Ende ist komplementär mit Azid bzw. Alkin funktionalisiert (Abbildung 76). Über eine CuAAC wird anschließend das Triazol-Gelenk erhalten und beide Stäbe miteinander verbunden.



Abbildung 76. Ausgangsverbindungen für einen FRET-Gelenkstab mit Coumarin (blau), DBD (rot), Alkin (grün) und Azid (grün).

Da bereits der Kern des Gelenkstabs beweglich ist, macht es keinen Sinn Gelenkstäbe mit flexibel gebundenen Fluorophoren darzustellen. Stattdessen werden die Fluorophore lediglich starr an die Stäbe angebracht. Die Stäbe können ausgehend von einer Vielzahl an Stabbausteinen aufgebaut werden (Werkzeugkasten-Prinzip). Für einen Azid-Stab wurde das bekannte Azid-Diol **87**^[42] (Abbildung 77) als auch das bekannte Azid-Keton **90**^[138] (Abbildung 78) synthetisiert. Ausgehend vom Diol **86**, das in vier Stufen und mit 52% erhalten wurde^[42], konnte das Azid **87** quantitativ hergestellt werden. Für NOYORI-Acetalisierungen wurde es in das entsprechende Silan **88** überführt.

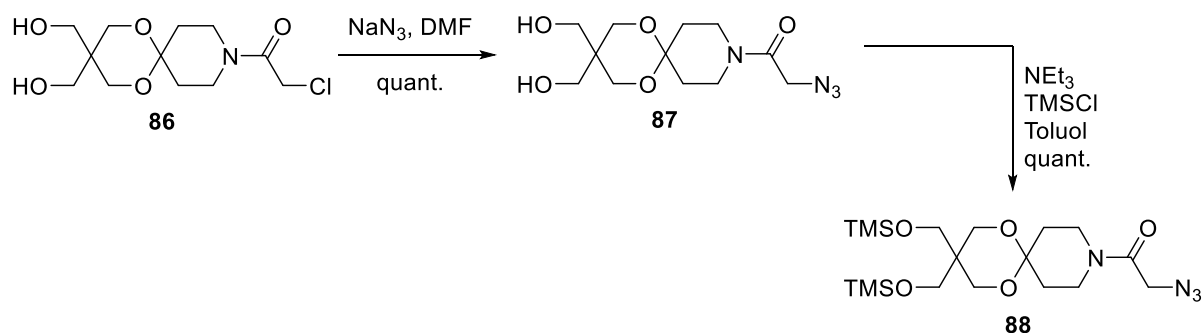


Abbildung 77. Synthese des Azids **88**.

Das Azid-Keton **90** wurde aus dem Chloracetyl-Keton **89**, welches über zwei Stufen mit 50% erhalten wurde^[42], ebenfalls quantitativ erhalten.

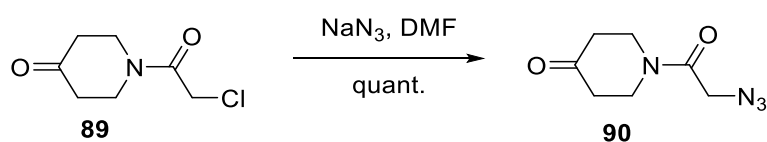


Abbildung 78. Synthese des Ketons **90**.

Die einfach-markierten Azid-Stäbe **92** und **91** wurden jeweils durch eine NOYORI-Acetalisierung ausgehend von den bereits bekannten Coumarin-Bausteinen **83** bzw. **10** und den Azid-Bausteinen **90** bzw. **88** synthetisiert (Abbildung 79). Verbindung **91** wurde, neben einigen Nebenprodukten, mit einer Ausbeute von 40% erhalten. Im Gegensatz zur missglückten Synthese der einfach markierten Coumarin-OSK-Stäbe **66** und **68**, wo lediglich die zweifach-markierten Cou-OSK-Stäbe **67** und **69** entstanden (vgl. Kapitel 4.1.8), konnte mit dem Baustein **88** ein asymmetrischer Cou-OSK-Stab aufgebaut werden. Jedoch sprechen die vielen Nebenprodukte und geringe Ausbeute auch hier dafür, dass es während der Reaktion zu Umacetalisierungen kommt.

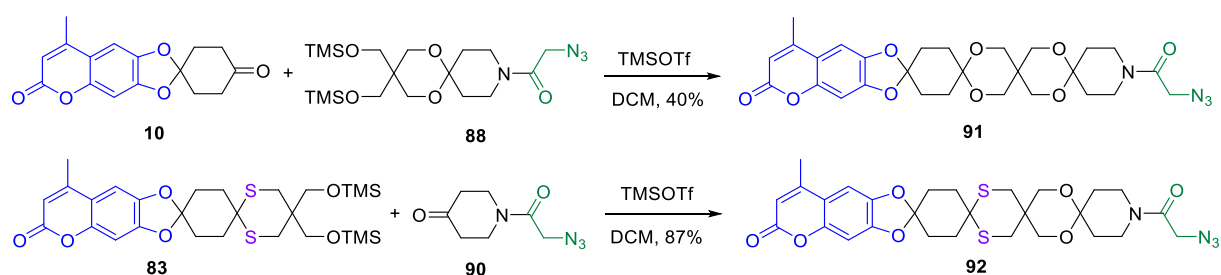


Abbildung 79. Synthese der Coumarin-Azid-Stäbe **92** und **91**.

Dagegen konnte der OSTK-Stab **92** mit einer guten Ausbeute von 87% erhalten werden. Beide Stäbe lassen sich in gängigen anorganischen Lösungsmitteln (DCM, CHCl_3 , EE) lösen, jedoch ist die Löslichkeit von **91** merklich besser gegenüber **92**. Die Ausbeuten betragen für **92** 14% über 10 Stufen und

für **91** 36% über 11 Stufen. Für die Synthese eines Alkin-Stabs wurden zwei unterschiedliche Alkin-Diole (**96**, **100**) dargestellt, da der DBD-Baustein lediglich als Keton vorlag. Verbindung **93** wurde nach der Literatur in drei Stufen mit einer Ausbeute von 55% erhalten^[42] und nach erfolgter Abspaltung der Schutzgruppe (Cbz), mit dem Aktivester **95** umgesetzt (Abbildung 80). Das Alkin-Diol **96** wurde mit einer Ausbeute von 66% erhalten und quantitativ zum Silan **97** umgesetzt.

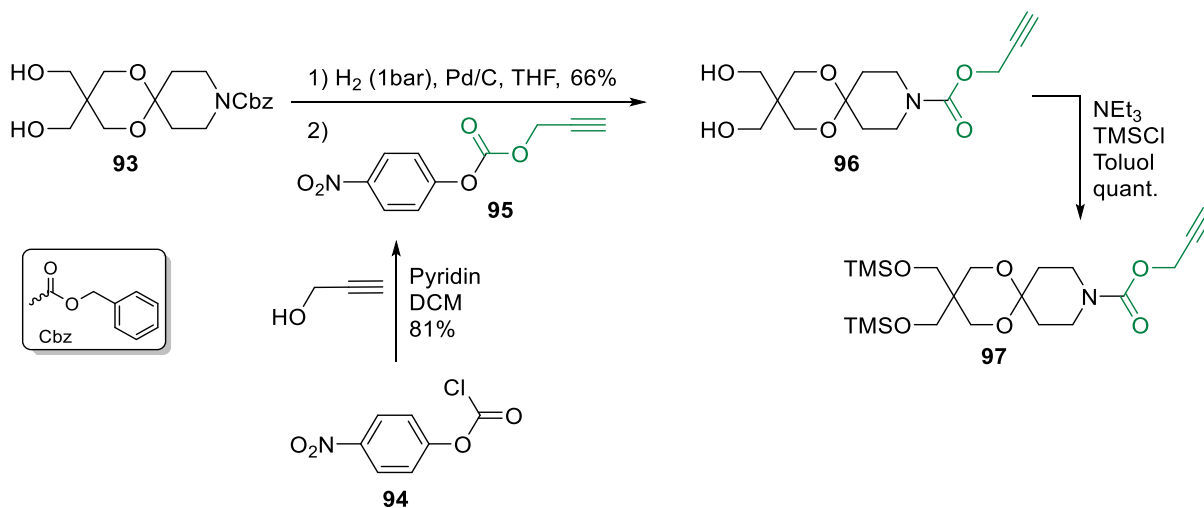


Abbildung 80. Synthese der Alkin-Stabbausteine **96** und **97**.

Um einen analogen S-Baustein darzustellen, wurde das bekannte Alkin-Keton **98** (Abbildung 83) mit dem Dithiol **75** zunächst über eine Iod-Acetalisierung in DCM (A) zum Alkin-Keton **99** umgesetzt (Abbildung 81). Da die Ausbeute mit 60% noch nicht zufriedenstellend war, wurde die Reaktion in Toluol (B) durchgeführt, was zur Steigerung der Ausbeute auf 87% führte. Das Silan **100** wurde quantitativ erhalten. Entsprechende Thioketal-Bausteine sind bisher kaum bekannt, weshalb es auch interessant ist den entsprechenden Azid-Baustein **101** herzustellen (Abbildung 82).

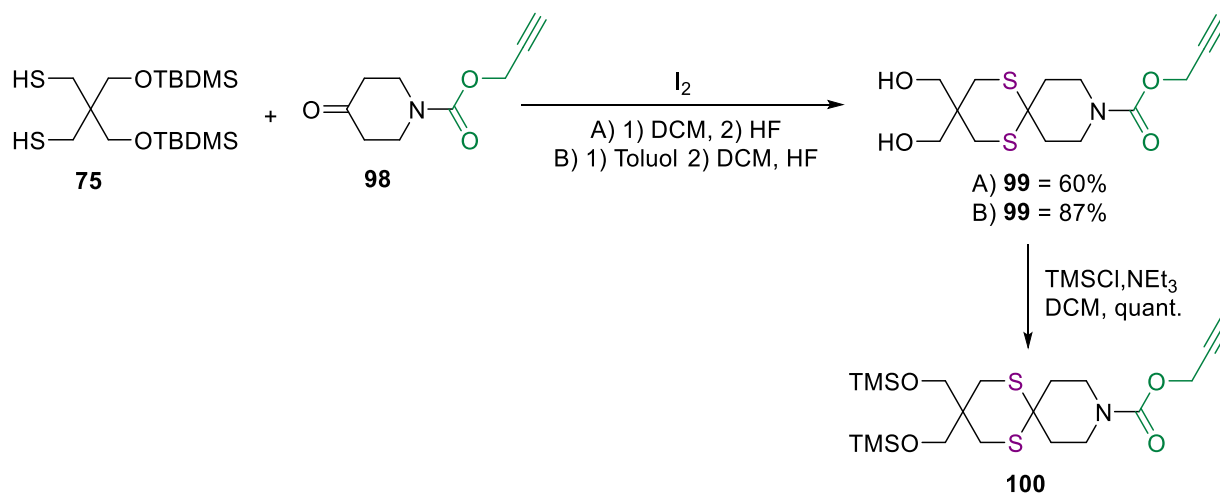


Abbildung 81. Synthese von **99** und **100**.

Bei der Wahl der gleichen Reaktionsbedingungen erzielte die Synthese jedoch nicht das gewünschte Produkt. Die Edukte reagierten nicht miteinander, wodurch auch keine Nebenprodukte entstanden. Lediglich die TBDMS-Schutzgruppe wurde über die Zeit, aufgrund des entstehenden Iodwasserstoffs, abgespalten. Hier wird einmal mehr deutlich, dass S-Acetalisierungen nicht trivial sind und es noch einige Hürden zu meistern gibt. Zur Darstellung von **101** können neben Iod noch andere Katalysatoren verwendet werden. Die Synthese wurde jedoch nicht weiter verfolgt.

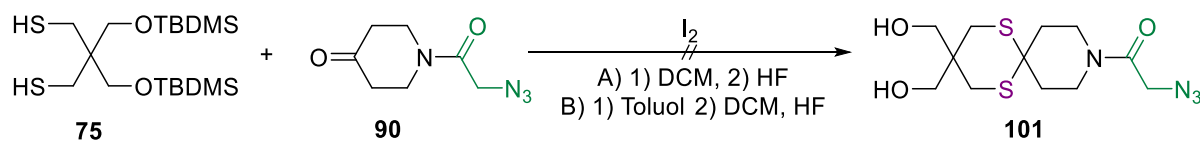


Abbildung 82. Synthese von **101**.

Das in Abbildung 81 verwendete Alkin-Keton **98** wurde ausgehend von 4-Hydroxypiperidin **102** in zwei Stufen mit 64% synthetisiert (Abbildung 83).^[158]

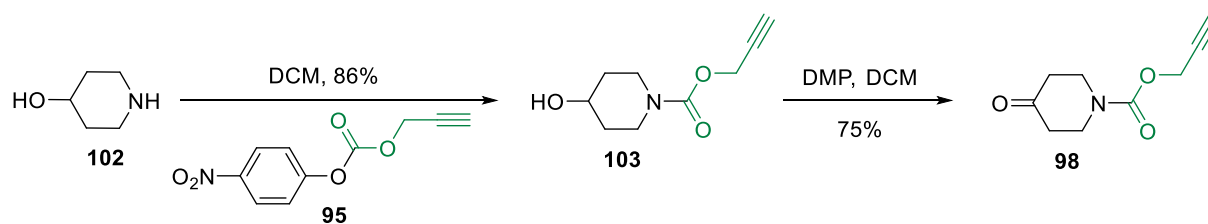


Abbildung 83. Synthese des Alkins **98**.

Die Diole **100** und **97** wurden daraufhin mit dem starren DBD-Baustein **27** über eine NOYORI-Acetalisierung erfolgreich zu den DBD-Alkin-OS(T)K-Stäben **104** und **105** umgesetzt. Entsprechend der Coumarin-Stäbe wurde auch in diesem Fall der O-Stab **105** mit einer geringeren Ausbeute (51%) erhalten als der S-Stab **104** (77%). Beide Stäbe lösen sich sehr gut in gängigen Lösungsmitteln (DCM, EE, CHCl_3), was aus den löslichkeitsvermittelnden Gruppen am DBD-Baustein resultiert. In beiden

stellt (Abbildung 85). Die Ausbeuten lagen zwischen 35% und 40% und konnten durch Variation der Katalysatorkonzentration nicht gesteigert werden. Die Edukte konnten zurückgewonnen werden. Eine Steigerung der Ausbeute durch Wahl eines anderen Katalysators wurde nicht weiter verfolgt. Beide Gelenkstäbe lösen sich gut in gängigen anorganischen Lösungsmitteln (DCM, EE). Von **106** und **107** wurden DSC-Messungen¹¹ durchgeführt, um diese auf flüssigkristalline Eigenschaften hin zu untersuchen. Flüssigkristallines Verhalten konnte jedoch ausgeschlossen werden. Für **106** wurde ein Glasübergang (T_G) bei 71 °C (Onset) ermittelt.

4.1.13 Spektroskopische Eigenschaften der FRET-Gelenkstäbe

Bei der spektroskopischen Analyse des Gelenkstabes muss beachtet werden, dass dieser gestreckt (STR) oder geknickt (FOL) vorliegen kann, wodurch sich sehr unterschiedliche Werte ergeben können (Abbildung 86).

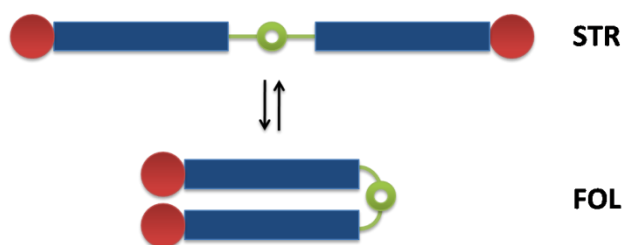


Abbildung 86. Allgemeine Struktur der Gelenkstäbe in gestreckter (STR) und geknickter (FOL) Form (blau = Stab, rot = terminale Funktionalitäten, grün = Gelenk).

WESSIG *et al.* untersuchten die Konformation eines analogen Gelenkstab-Gerüsts in Lösung mittels Molecular Dynamics (MD)-Simulation. Dieser ist in Abbildung 87 dargestellt. Für den End-zu-End-Abstand der N-Atome **a** und **b** wurde eine bimodale Verteilung erhalten, die sowohl auf eine geknickte (**I**, $R \approx 7 \text{ \AA}$) als auch auf eine gestreckte Konformation (**II**, $R \approx 27 \text{ \AA}$) hinweist. Die ermittelten Konformationen ähneln denen in Abbildung 87, wobei die Stäbe der geknickten Konformation **I** annähernd parallel zueinander stehen.^[46] Um dieses Gleichgewicht näher zu untersuchen, ersetzten WESSIG *et al.* die Reste R^1 durch Pyren, welches im angeregten Zustand Excimere bildet. Excimere sind kurzlebige Dimere (oder Oligomere), die eine separate bathochrom-verschobene Emissionsbande (Pyren: $\Delta\lambda \approx 100 \text{ nm}$) zeigen.^[159] Der Pyren-Gelenkstab wurde in unterschiedlichen Lösungsmitteln (Viskosität) und bei verschiedenen Temperaturen mit einer sehr geringen Stab-Konzentration vermessen, um intermolekulare Excimer-Bildung auszuschließen. Es zeigte sich, dass die Excimer-Emission mit sinkender Temperatur abnahm. Bei 77K in einer festen EPA-Matrix¹² verschwand die Excimer-Emissionsbande vollständig, wodurch anzunehmen ist, dass STR **II** dem globalen Minimum

¹¹ DSC = dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*)

¹² EPA = Et₂O/Isopentan/EtOH 5/5/2. Das Lösungsmittelgemisch erstarrt glasartig bei Abkühlung und ist für die Messung bei tiefen Temperaturen (z.B. 77K) optisch durchsichtig.

entspricht. Bezüglich steigender Viskosität (bei gleicher Temperatur) verkleinerte sich der Excimeren-Anteil im Emissionsspektrum, sodass sich das Gleichgewicht, bei steigender Viskosität, zur gestreckten Konformation hin verschiebt. Der Vergleich zwischen protischen und aprotischen Lösungsmitteln ähnlicher Viskosität zeigte, dass sich die hydrophoben Stäbe in protischen Lösungsmitteln vorwiegend einknicken (erhöhte Excimer-Emission) und so ihre Oberfläche verkleinern.^[46]

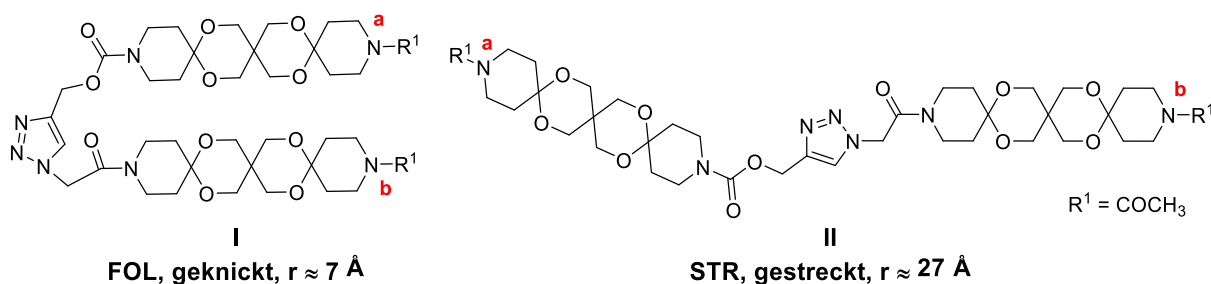


Abbildung 87. Stabile Konformere (I, II) eines Gelenkstabes. Die Abstände wurden mittels MD-Simulationen berechnet.^[46]

Tabelle 12. Spektroskopische Eigenschaften der einfach-markierten Stäbe **91**, **92**, **105** und **104**

Verbindung	LSM	$\lambda_{\text{abs}}^a / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}^a / \text{nm}$	τ_F / ns
91	CHCl_3	343	402	1.2 ^b
	ACN	342	410	0.9 ^b
92	CHCl_3	343	402	1.3 ^b
	ACN	342	410	0.8 ^b
105	CHCl_3	439	555	23.0 ^c
	ACN	432	552	20.9 ^c
104	CHCl_3	439	555	22.7 ^c
	ACN	432	553	20.7 ^c

^a $\Delta\lambda = \pm 2$, ^b $\lambda_{\text{exc}} = 372 \text{ nm}$, ^c $\lambda_{\text{exc}} = 447 \text{ nm}$

In Tabelle 12 sind zunächst die spektroskopischen Eigenschaften der einfach-markierten Stäbe **91**, **92**, **105** und **104** zusammengefasst. Sie ähneln den spektroskopischen Eigenschaften ihrer einfach-markierten Stab-Analoga Cou-OSTK **78** bzw. DBD-OSTK **80** und zeigen keine besonderen Auffälligkeiten. In Tabelle 13 sind den spektroskopischen Eigenschaften der Gelenkstäbe **106** und **107** dargestellt.

Tabelle 13. Spektroskopische Eigenschaften der Gelenkstäbe **106** und **107**

Verbindung	LSM	λ_{abs}^a / nm	λ_{em}^a / nm	τ_F^b / ns	ϕ_F^c
106	CHCl ₃	347, 438	399, 556	22.4 (A)	0.11 ± 0.003 (D) 0.39 ± 0.03 (A)
	DCM	345, 434	400, 545	22.9 (A)	-
	DCE	344, 434	406, 540	20.9 (A)	-
	Aceton	342, 430	405, 542	0.4 (92%), 7.0 (7%) (D) ^d 18.7 (A)	0.04 ± 0.003 (D) 0.29 ± 0.03 (A)
	DMSO	344, 438	402, 561	23.1 (A)	-
	ACN	343, 433	404, 555	19.9 (A)	-
	<i>t</i> BuOH	345, 440	400, 566	20.4 (A)	-
	<i>i</i> Propanol	-, 440	403, 574	17.6 (A)	-
	EtOH	345, 440	406, 581	0.7 (66%), 2.8 (34%) (D) ^d 9.2 (A) ^d	-
	MeOH	345, 440	409, 597	7.9 (A)	-
	Glycerin	340, 440	414, 570	16.3 (A)	-
	H ₂ O	344, 440	419, 566	14.5 (A)	-
	PBS	348, 437	414, 548	4.1 (D) ^d 5.2 (36%), 14.1 (64%) (A) ^d	-
	LUV	348, 425	408, 557	0.8 (44%), 3.4 (56%) (D) ^d 12.0 (A) ^d	-
107	CHCl ₃	347, 436	400, 550	23.1 (A)	0.07 ± 0.003 (D) 0.22 ± 0.03 (A)
	Aceton	343, 426	400, 540	19.2 (A)	0.06 ± 0.003 (D) 0.20 ± 0.03 (A)
	PBS	347, 436	400, 566	16.9 (A)	0.06 ± 0.003 (D) 0.28 ± 0.03 (A)

^a $\Delta\lambda = \pm 2$, ^b $\lambda_{\text{exc}} = 372$ nm, gemessen bei $\lambda_{\text{em, Cou}}$ für Donor (D) bzw. bei $\lambda_{\text{em, DBD}}$ für Akzeptor (A),

$\Delta\tau_F = \pm 0.1$; ^c $\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{abs, Cou}}$, ^d vermessen von URSULA EISOLD

Da sich beide Gelenkstäbe (**106** und **107**) strukturell kaum voneinander unterscheiden, wurde hauptsächlich Verbindung **106** spektroskopisch vermessen. Die Absorption- und Emissionswellenlängen entsprechen etwa denen der FRET-Stäbe Cou-OSTK-DBD **85** bzw. Cou-OSTK-f-DBD **84**. Für **106** wurden teilweise biexponentielle Fluoreszenzabklingzeiten des Donors und Akzeptors detektiert. Die Fluoreszenzlebensdauern des Akzeptors von **106** sind sowohl in H₂O/ PBS als auch im LUV im Gegensatz zum Edukt **27** ($\tau_{F,27,PBS} = 6.4$ ns, $\tau_{F,27,LUV} = 7.0$ ns) stark erhöht. Über die Fluoreszenzlebensdauer kann daher

zunächst keine Aussage über eine erfolgreiche Einlagerung in die Vesikelmembran getroffen werden. An dieser Stelle stehen noch Anisotropiemessungen aus, die ein detaillierteres Bild über den Einbau in die Vesikelmembran liefern. Die Emissionswellenlängen in PBS und LUV geben ebenfalls keine Aussage darüber. Ein Vergleich der Quantenausbeuten von **106** zeigt, dass diese in CHCl_3 größer ist als in Aceton. Obwohl für das Edukt Cou **19** die Quantenausbeute mit steigender Polarität des Lösungsmittels ansteigt. Die kleinere Quantenausbeute in Aceton hat hier vermutlich damit zu tun, dass der hydrophobe Gelenkstab vorwiegend geknickt vorliegt, wohingegen in CHCl_3 keine bevorzugte Konformation angestrebt wird. In **107** ist solch ein Effekt jedoch nicht erkennbar. Insgesamt sind die Fluoreszenzquantenausbeuten der Donoremission stark verkleinert bzgl. des Eduktes Cou **19**, was für einen effizienten FRET spricht. Aber auch die Akzeptorquantenausbeuten sind für CHCl_3 und Aceton stark vermindert ($\phi_{F,80, \text{CHCl}_3} = 0.67$, $\phi_{F,79, \text{Aceton}} = 0.54$). Die theoretische FRET-Effizienz lässt sich für den Gelenkstab **106** bzw. **107** für ausgewählte D-A-Abstände berechnen. In der gestreckten Konformation ergibt sich ein D-A-Abstand zwischen den Punkten 1 und 2 von 3.92 nm, wie in Abbildung 88 dargestellt.

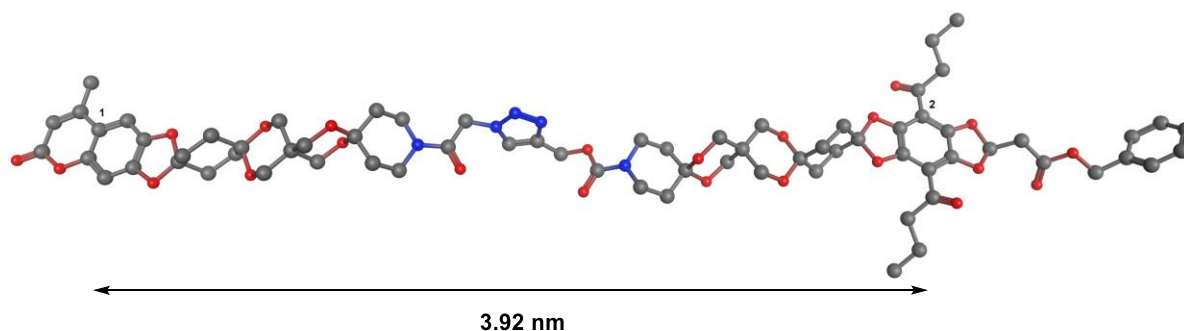


Abbildung 88. Konformationsanalyse von **106** (Molecular Dynamics (MD)-Simulation, Programm MOE 2010.10, Kraftfeld MMFF94x, berechnet von P. WESSIG).

Da sich die Gelenkstab-Konformation in einem Gleichgewicht zwischen gestreckter und geknickter Konformation bewegt, muss trotz der starren Fluorophore zunächst ein κ^2 -Wert von 2/3 angenommen werden. Die Lage der Übergangsdipolmomente zueinander ändert sich ständig. Für DMSO ergibt sich nach Tabelle 14 für die gestreckte Konformation ein theoretischer Förster-Abstand R_0 von 2.2 nm, wodurch eine theoretische FRET-Effizienz von lediglich 3% vorhanden ist. Diese Werte entsprechen jedoch nicht der Realität, da der Stab sich kontinuierlich bewegt und damit der D-A-Abstand variiert.

Tabelle 14. FRET-Parameter von **106** bzw. **107** in DMSO für die gestreckte Konformation

LSM	Brechungsindex	κ^2	Abstand D-A / nm	J / cm^6	R_0 / nm	$E_{\text{FRET, theor.}}$
DMSO	1.4793	2/3	3.92	$3.9 \cdot 10^{-15}$	2.2	0.03

Die Vermessung des Gelenkstabes **106** in einer EPA-Matrix bei 77K zeigt, dass die Emissionswellenlänge des Akzeptors DBD hypsochrom ($\Delta\lambda = 18$ nm) verschoben ist (siehe Tabelle 15). Dieser Umstand ergibt sich aus der Stabilisierung des elektronischen Grundzustands aufgrund der geringeren Solvation, wodurch auch die Fluoreszenzabklingzeit zunimmt (im Vergleich zu EPA-RT). Der gleiche Effekt wurde auch bei Cou-OSTK-DBD **85** gemessen, wobei hier die hypsochrome Verschiebung der Akzeptoremission mit $\Delta\lambda = 46$ nm sehr viel stärker ausgeprägter ist.

Tabelle 15. Spektroskopische Untersuchung vom Gelenkstab **106** und Cou-OSTK-DBD **85** in EPA

Verbindung	LSM	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{a}}$ / nm	$\lambda_{\text{em}}^{\text{a}}$ / nm	$\tau_{\text{F,A}}^{\text{b}}$ / ns
106 Gelenkstab	EPA (RT) ^d	333, 430	395, 563	18.6
	EPA (77K)	-	389, 545	23.8
85 Cou-OSTK-DBD	EPA (RT) ^d	343, 432	399, 568	19.7
	EPA (77K)	-	390, 522	23.4

^a $\Delta\lambda = \pm 2$, ^b $\lambda_{\text{exc}} = 372$ nm (Donorabsorption), gemessen bei $\lambda_{\text{em,DBD}}$, $\Delta\tau_{\text{F}} = \pm 0.1$; EPA = Diethylether/ *i*Pentan/ Ethanol 5:5:2, ^d RT = Raumtemperatur

In Abbildung 89 sind die Emissionsspektren beider FRET-Stäbe in EPA bei RT bzw. 77K dargestellt. Die Coumarin-Emissionsbande ist für den Gelenkstab **106** sehr stark ausgeprägt, was für eine sehr viel schlechtere FRET-Effizienz spricht, als sie bei **85** zu finden ist. Des Weiteren sind die Coumarinbanden bei 77K im Gegensatz zur RT-Messung für beide Stäbe vergrößert.

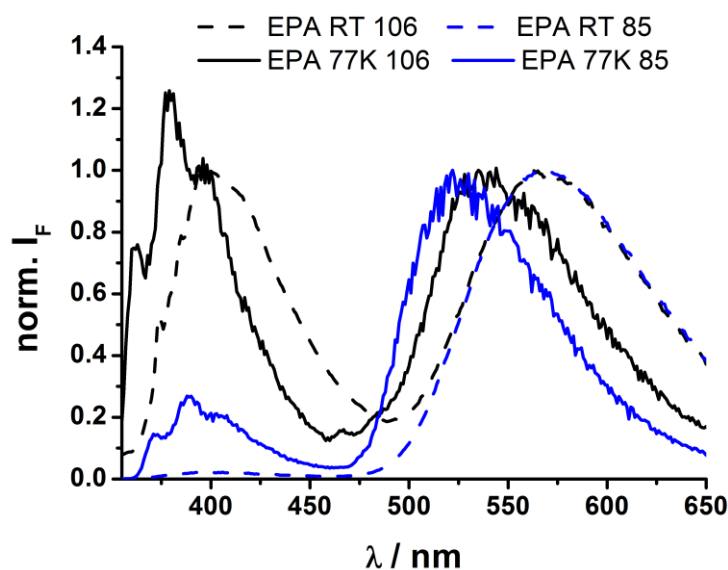


Abbildung 89. Emissionsspektren von **106** (schwarz, $\lambda_{\text{exc}} = 333$ nm) und **85** (blau, $\lambda_{\text{exc}} = 343$ nm) in EPA bei RT (gestrichelte Linie) und 77K (durchgezogene Linie), EPA = Diethylether/ *i*Pentan/ Ethanol 5:5:2.

Eine Aufstellung der Emissionsspektren von **106** und **85** nach Lösungsmittelpolarität ist in Abbildung 90 dargestellt. Die Intensität der Coumarinbanden von **106** nimmt mit steigender Lösungsmittelpolarität zu, was dafür spricht, dass in polaren Lösungsmitteln vorwiegend die gestreckte Stabkonformation vorherrscht. In Wasser ist die Coumarinbande jedoch weniger stark ausgeprägt. Dieser Gegensatz und der Umstand, dass sich die hydrophoben Gelenkstäbe in polaren Lösungsmitteln eher zusammenfalten, sprechen gegen die Theorie, dass das Gleichgewicht in polaren Lösungsmitteln auf Seiten der gestreckten Stabkonformation liegt. Ein Vergleich mit **85** zeigt, dass auch hier die Intensität der Coumarinbande mit steigender Lösungsmittelpolarität leicht zunimmt. Letzterer Effekt ist jedoch lediglich auf die Veränderung der FRET-Parameter $J(\lambda)$, n_D , $\phi_{F,D}$ und ϵ_A bezogen und nicht auf eine Annäherung der Fluorophore, die mit einer Änderung von κ^2 (Übergangsdipolmomente) und des D-A-Abstands einhergeht.

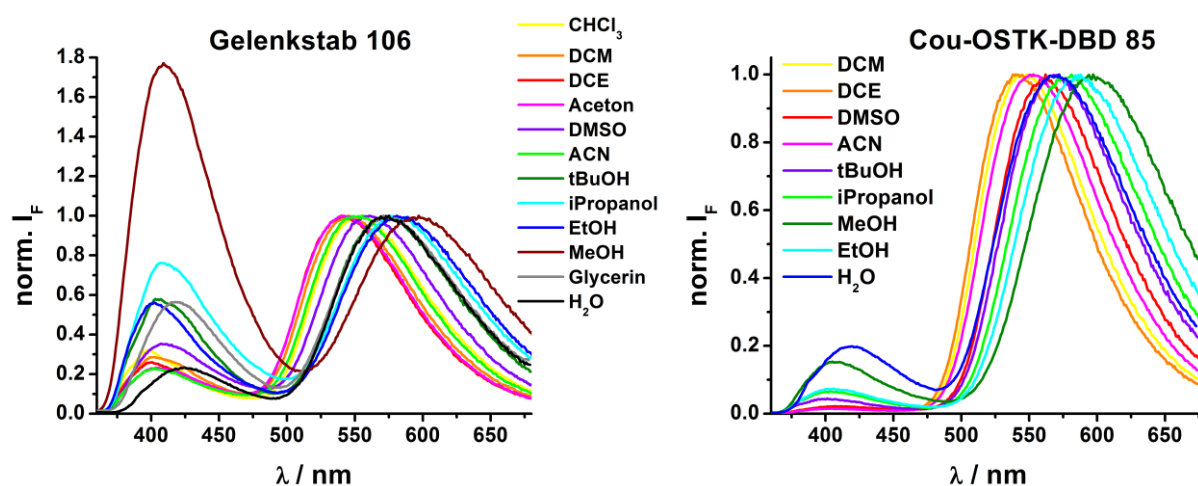


Abbildung 90. Emissionsspektren von **106** und **85** in unterschiedlichen Lösungsmitteln ($\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{abs}}$)

Die spektroskopischen Untersuchungen der Gelenkstäbe **106** und **107** in verschiedenen Lösungsmitteln und im Vesikel sind bisher noch nicht abgeschlossen und können daher an dieser Stelle nicht näher ausgeführt werden.

4.1.14 Stabverlängerungen

Um dem Förster-Abstand R_0 der zweifach-markierten, starren FRET-Stäbe ($R_0 \geq 3$ nm) näher zu kommen, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die dargestellten OSTK-Stäbe auf unterschiedliche Weise zu verlängern. Ein möglicher Verlängerungsbaustein ist das 1,3-Dithiol **110** (Abbildung 91). Ausgehend von 1,3-Dibrom-2-propanol (**108**) wurde das Disulfid **109** synthetisiert welches ohne Aufreinigung zu **110** reduziert wurde. Die Synthesesequenz wurde im Arbeitskreis WESSIG optimiert.^[78]

Wahl einer geeigneten Thiol-Schutzgruppe ist begrenzt, da viele Schutzgruppen unter harschen Bedingungen abgespalten werden müssen (z.B. Trityl mit konz. TFA oder HCl), Ketale und Acetale jedoch säurelabil sind. Des Weiteren ist es von Vorteil, wenn die Schutzgruppe selektiv das Thiol schützt und der Alkohol nicht separat geschützt werden muss. Die Mmt-Schutzgruppe vereint beide Forderungen, da sie mild mit 1%iger TFA in DCM abgespalten werden kann und selektiv das Thiol schützt. Des Weiteren lässt sich die Mmt-Schutzgruppe ohne zusätzliche Base einsetzen, wodurch die Deprotonierung und Schützung des Alkohols ausgeschlossen werden kann.^[163]

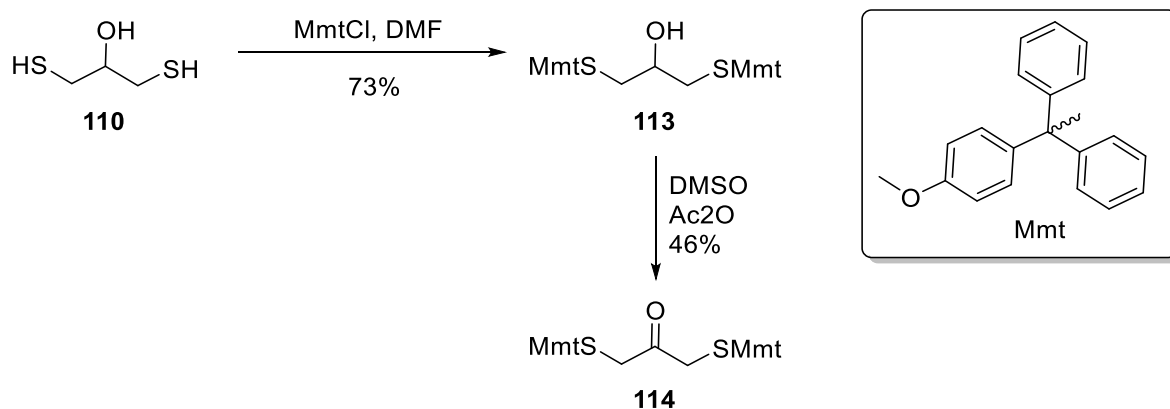


Abbildung 93. Synthese von **114**.

Verbindung **114** wurde mit **83** über NOVORI acetalisiert und es wurde sowohl das einfach- (13%) als auch das zweifach-(51%) geschützte Produkt **115** erhalten (Abbildung 94). Die Mmt-Schutzgruppe lässt sich demnach auch mit TMSOTf abspalten, was in diesem Fall kein Problem darstellt, da die Mmt-Schutzgruppe im nächsten Schritt abgespalten wird. Dafür wurden beide Produkte **115** mit 1% TFA und Et₃SiH als Kationenfänger zum Dithiol **116** umgesetzt. Da die Abspaltung nach 24h noch nicht abgeschlossen war, wurde die Reaktion für weitere 24h gerührt, woraufhin viele Nebenprodukte entstanden. Hier kam es wahrscheinlich zur Aufspaltung der Ketalstrukturen, da auf der Dünnschicht (DC) auch das Diol von **83** zu erkennen war. Wobei die TMS-Schutzgruppe auch nach langem Rühren in TMSOTf abgespalten werden kann. Neben **115a** und **115b** war auch das Produkt **116** auf dem DC zu erkennen. Aufgrund der vielen Nebenprodukte wurde das Produktgemisch von **116** nicht weiter gereinigt. Da die Abspaltung von Mmt am OSTK-Stab nicht vollständig möglich war und vielen Nebenprodukte entstanden, wurde noch eine weitere Schutzgruppe getestet.

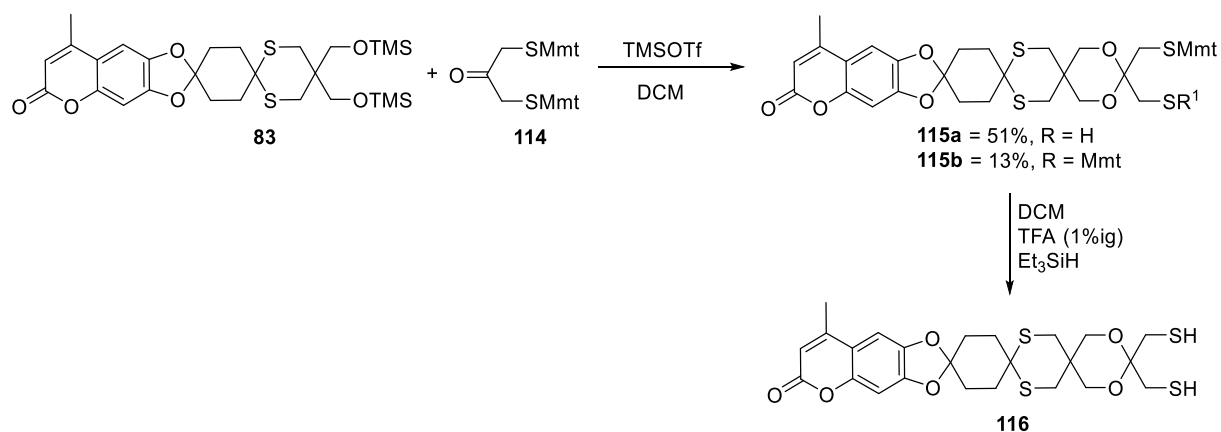


Abbildung 94. Synthese des erweiterten Coumarin-Bausteins **116**.

Naheliegender war die Verwendung der basenlabilen Acetat-Schutzgruppe (Ac), da OS(T)K-Stäbe basenstabil sind. Dafür wurde das Keton **117** verwendet, das von SEBASTIAN HÜBNER¹³ zur Verfügung gestellt wurde (Abbildung 95). Um die Stabilität bzw. Abspaltbarkeit der Thioacetatgruppe zu testen, wurde zunächst der Testbaustein **119** synthetisiert. Verbindung **117** lässt sich in guter Ausbeute über NOYORI-Acetalisierung an **76** anbringen. Das entstandene Thioacetat **118** wurde daraufhin quantitativ mittels K₂CO₃ zum Thiol **119** umgesetzt.

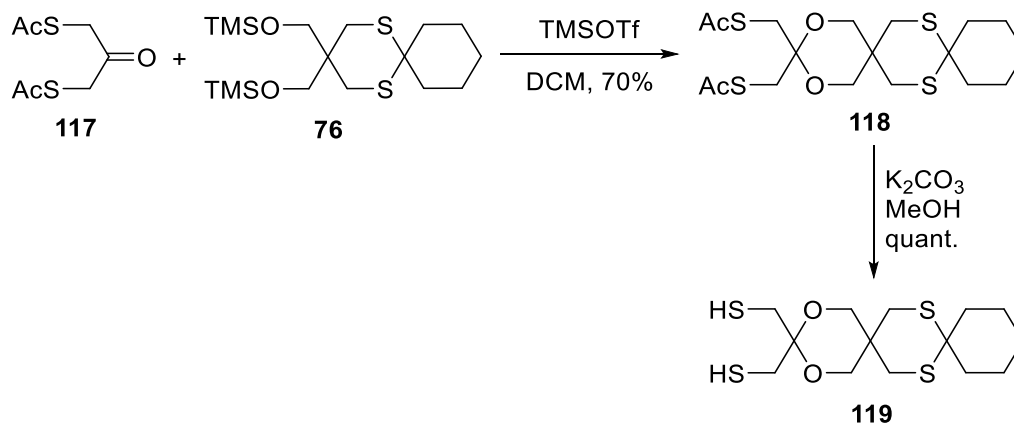


Abbildung 95. Testsystem für die Thioacetat-Schutzgruppe.

Aufgrund der quantitativen Abspaltung der Schutzgruppe wurde das Keton **117** mit dem Coumarin **83** über NOYORI zu 46% acetalisiert. Die Abspaltung der Acetat-Schutzgruppe erfolgte auch hier quantitativ. Verbindung **116** kann anschließend wieder mit einem beliebigen Stabbaustein, mit **117** oder mit dem DBD-Fluorophor **27** zu einem verlängerten OSTK-Stab umgesetzt werden. Letzterer OSTK-Stab (**121**) würde um einen Ring länger sein als Cou-OSTK-DBD **85**.

¹³ Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie, Institut für Chemie, Universität Potsdam

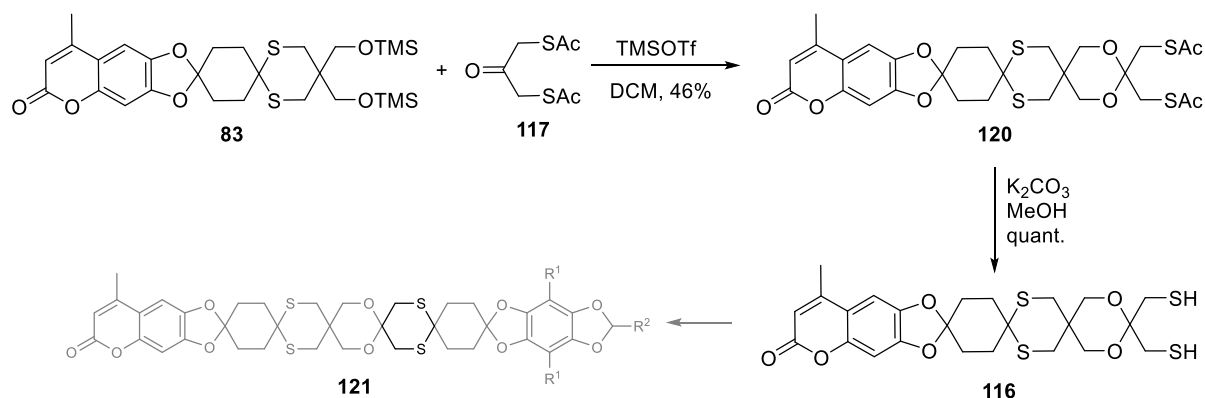


Abbildung 96. Synthese des erweiterten Coumarin-Bausteins **116** über **117**.

Die Synthese eines verlängerten zweifach-funktionalisierten FRET-OSTK-Stabs wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es wäre jedoch sehr von Interesse einen verlängerten Stab auf seine Löslichkeit hin zu untersuchen und FRET-basierte spektroskopische Messungen durchzuführen.

4.1.15 Funktionalisierung der Coumarin-Derivate

Für die dargestellten Sensor-OS(T)K-Stäbe wäre es von großem Nutzen, wenn die Möglichkeit bestünde neben dem DBD- auch den Coumarin-Fluorophor zu funktionalisieren. Dafür eignet sich vor allem die CH_3 -Gruppe in der 4-Position (Abbildung 97). Hierfür sollte **19** über eine Wohl-Ziegler-Bromierung mit N-Bromsuccinimid (NBS), katalytischen Mengen an Dibenzoylperoxid unter Rückfluss in CCl_4 radikalisch zum Coumarin **122a** umgesetzt werden. Statt des zu erwartenden in 4-Position seitenkettenbromierten Coumarins **122a** ^[164], wurde das in 3-Position kernbromierte Coumarin **122b** in 46% erhalten. Normalerweise wird gerade die Wohl-Ziegler-Bromierung verwendet, um die Benzylstellung des Allylsystems zu bromieren und nicht die Doppelbindung. Da die Bildung des Radikals in 3-Position reversibel und in 4-Position irreversibel ist und durch NBS bzw. den radikalischen Mechanismus die Br^- -Konzentration gering gehalten wird, wird vornehmlich die Benzylstellung bromiert. Auch die Literatur zeigt, dass ähnliche Coumarin-Derivate, über die dargestellten Reaktionsbedingungen, selektiv seitenketten-bromiert werden können. Bei der Reaktion entstanden nur geringfügig Nebenprodukte und **19** konnte mit 47% zurückgewonnen werden. Es ist jedoch auch möglich **122b** weiter zu funktionalisieren. Da sich das Brom bzw. die neue funktionelle Gruppe direkt am Chromophor befindet, ändern sich auch die spektroskopischen Eigenschaften des Coumarins. In diesem Fall muss darauf geachtet werden, dass DBD und Coumarin weiterhin spektral überlappen. Zur Funktionalisierung des Coumarin-Bausteins eröffnen sich noch mehrere andere Möglichkeiten, unter anderem der Aufbau von Coumarin über die Pechmann-Kondensation oder der Knoevenagel-Kondensation. Eine weitere Funktionalisierung des Coumarins **19** bzw. **122b** wurde jedoch nicht weiter verfolgt.

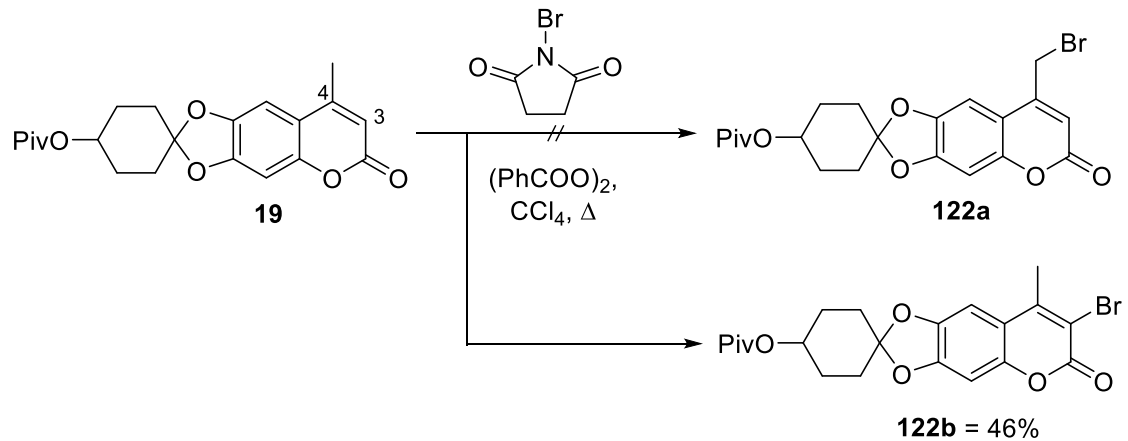


Abbildung 97. Synthese des bromierten Coumarins **122**.

In Abbildung 98 sind die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Cou **19** (blau) und Cou-Br **122b** (rot) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Proton in der 3-Position in **122b** nicht mehr vorhanden ist (gelbe Markierung) und durch das Brom substituiert wurde. Die Methylgruppe in 4-Position wird durch die Nähe zum Brom stärker abgeschirmt (grüne Markierung).

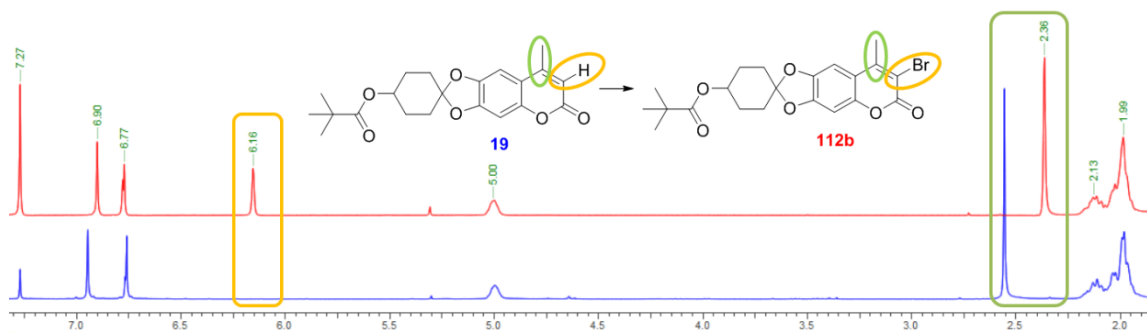


Abbildung 98. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Cou **19** (blau) und Cou-Br **122b** (rot).

Da bekannt ist, dass der Schweratomeffekt von Halogenen positive Auswirkungen auf die Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren hat, sollte auf dieser Grundlage ein weiteres neuartiges FRET-Paar dargestellt werden, dass eine Anregung im NIR-Bereich zulässt (Kapitel 4.2).^[165,166]

4.2 2P-FRET-Paar

Eine erste 2P-Untersuchung von **122b** und den Fluorophoren Cou **19** und DBD **57** zeigte, dass alle drei Fluorophore bei einer Anregungswellenlänge von 780 nm 2P-angeregt werden können. In Abbildung 99 wird jedoch deutlich, dass das Brom in **122b** einen erheblichen Effekt auf die 2P-Anregbarkeit bzw. auf den 2P-Absorptionsquerschnitt σ_2 ausübt. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde ein neues FRET-Paar analog zu Cou-f-DBD **64** synthetisiert.

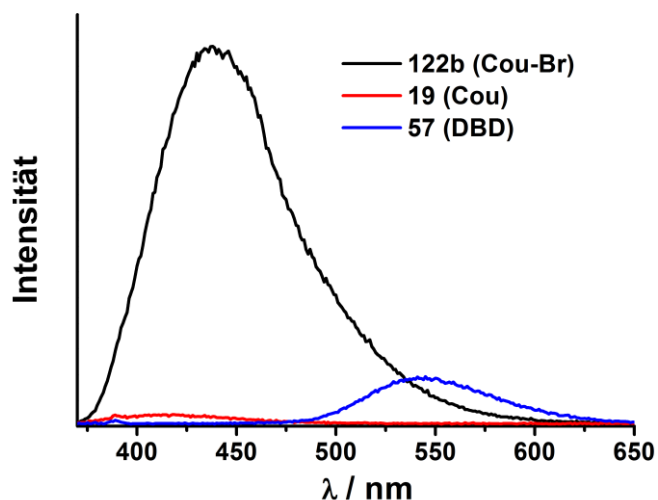


Abbildung 99. Emissionsspektren von Cou-Br **122b** (schwarz), Cou **19** (rot) und DBD **57** (blau) in ACN bei $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ und $c = 3.55 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Für die Bromierung der 3-Position von **12** wurden mildere Reaktionsbedingungen gewählt als bei **122**, die direkt zum gewünschten Produkt führen (Abbildung 100). Verbindung **12** wurde mittels NBS quantitativ kernbromiert. Die Darstellung des FRET-Paares **127** erfolgte analog zur Synthese von **64** ebenfalls in guten Ausbeuten. Insgesamt wurde **127** ausgehend von Coumarin **8** und Sesamol **28** in 11 Stufen mit einer Ausbeute von 32% erhalten.

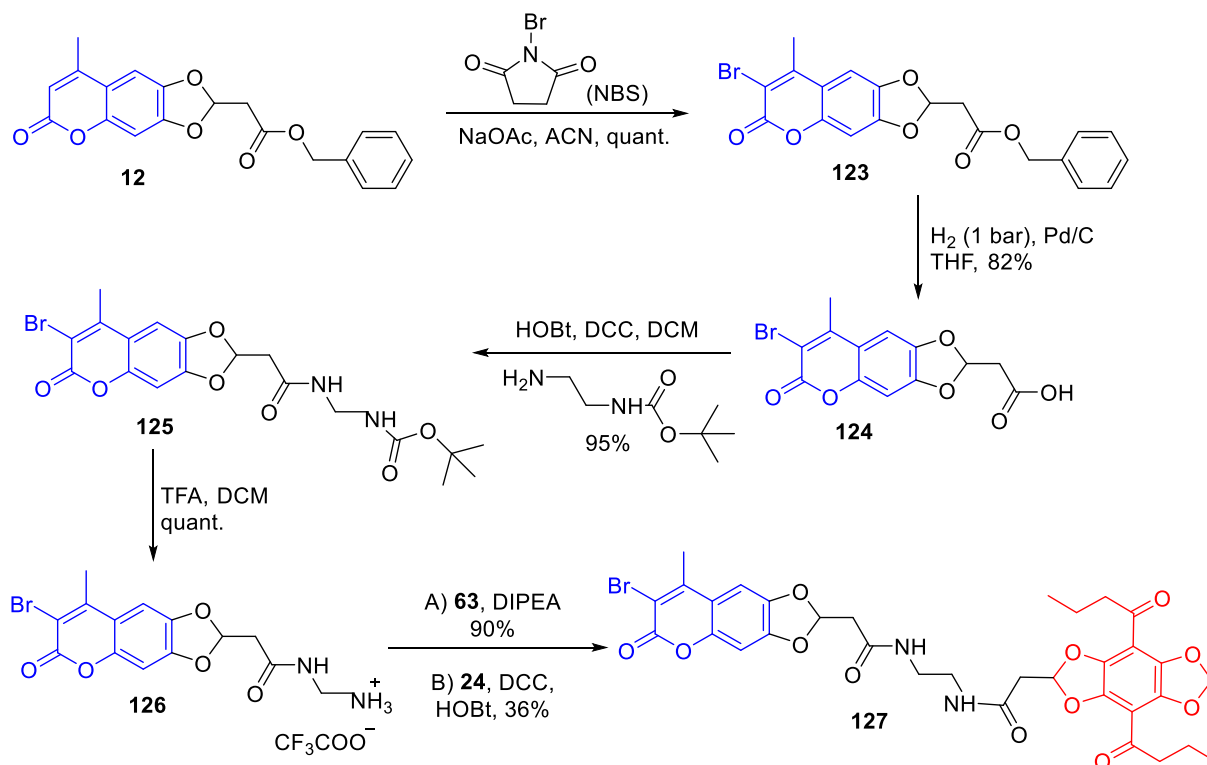


Abbildung 100. Synthese des FRET-Paares **127**.

4.2.1 Spektroskopische Eigenschaften des 2P-FRET-Paares

Im Folgenden wird auf die spektroskopischen Eigenschaften des 2P-FRET-Paares **127** eingegangen und dessen Anwendung für 2P-FLIM Messungen (Kapitel 4.2.2) demonstriert.

In Tabelle 16 sind die spektroskopischen Eigenschaften λ_{abs} , λ_{em} , τ_{F} , ϵ und der 2P-Absorptionsquerschnitt (σ_2) von Cou **12**, Cou-Br **123**, DBD **24** und Cou-Br-f-DBD **127** dargestellt. Der Vergleich zwischen Cou **12** und dessen bromierten Analogon Cou-Br **123** zeigt, dass Cou-Br **123** leicht bathochrom verschoben ist. Die Fluoreszenzlebensdauern sind etwa doppelt so lang und auch die Quantenausbeuten und die Extinktionskoeffizienten sind mit Ausnahme von $\tau_{\text{F,DMSO}}$ ebenfalls größer.

Tabelle 16. Spektroskopische Daten von Cou **12**, Cou-Br **123**, DBD **24** und Cou-Br-f-DBD **127**

Verb.	LSM	λ_{abs} / nm	λ_{em} / nm	τ_{F} / ns	ϵ / $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	ϕ_{F}	$\sigma_2 / \text{GM}^{\text{a}}$ ($\lambda_{\text{exc}}=780\text{nm}$)	$\sigma_2 / \text{GM}^{\text{a}}$ ($\lambda_{\text{exc}}=720\text{nm}$)
12 Cou	DCM	342	400	0.8 ^b	10425	0.11	0.01 ± 38%	-
	DMSO	343	413	0.8 ^b	10878	0.23	0.01 ± 17%	-
	ACN	340	410	0.8 ^b	13355	0.10	0.01 ± 26%	-
123 Cou-Br	DCM	351	424	2.1 ^b	15503	0.36	0.26 ± 06%	17.22 ± 1.9%
	DMSO	353	436	1.3 ^b	15269	0.17	0.74 ± 12%	8.58 ± 0.5%
	ACN	349	429	1.6 ^b	15168	0.22	0.41 ± 10%	13.86 ± 3.6%
24 DBD	DCM	439 ^e	548 ^e	24.8 ^{c,e}	4300 ^e	0.35 ^e	0.16 ± 03%	-
	DMSO	437	570	24.8 ^c	3094	0.68	0.04 ± 03%	-
	ACN	426 ^e	545 ^e	21.4 ^{c,e}	5683 ^e	0.41 ^e	0.20 ± 18%	-
127 Cou-Br- f-DBD	DCM	353, 436	550	25.5 ^d	-	-	-	-
	DMSO	355, 434	570	23.5 ^d	-	-	-	-
	ACN	350, 430	559	22.2 ^d	-	-	-	-

^a $\text{GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1}$ (Dreifachmessung); ^b Fluoreszenzlebenszeit wurde detektiert bei 420 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 372 \text{ nm}$); ^c Fluoreszenzlebenszeit wurde detektiert bei 570 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$); ^d Fluoreszenzlebenszeit wurde detektiert bei 570 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 372 \text{ nm}$); ^e entnommen aus^[40]

Des Weiteren wurden die σ_2 bei $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{exc}} = 720 \text{ nm}$ bestimmt. Wie zu erwarten war, zeigt Cou **12** keine nennenswerte 2PA ($\sigma_2 = 0.01 \text{ GM}$). Die σ_2 gängiger organischer Fluorophore sind oft sehr klein, was bei einem einfachen Coumarin-Gerüst ebenfalls der Fall ist. Jedoch können durch gezielte Erweiterung des Chromophors auch Werte $>1000 \text{ GM}$ erreicht werden.^[167,168] Durch die Einführung von Brom und Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$ ergeben sich für Cou-Br **123** bereits spektroskopisch brauchbare σ_2 zwischen 0.26 GM und 0.74 GM, ähnlich wie in der Literatur beschrieben.^[54,55] Durch Anregung bei $\lambda_{\text{exc}} = 720 \text{ nm}$ wird eine immense Steigerung der σ_2 , auf bis zu 17.22

GM, erreicht. Da 720 nm annähernd der doppelten Anregungswellenlänge der 1PA von Cou-Br **123** entspricht, ist in dem Fall die Resonanzbedingung der Anregung des Fluorophors besser erfüllt als bei $\lambda_{\text{exc}} = 780$ nm. Der DBD-Fluorophor **24** zeigt ebenfalls eine schwache 2PA von 0.4 GM - 0.20 GM. Die Steigerung des σ_2 von DBD **24** hin zu Cou-Br **123** ist bei $\lambda_{\text{exc}} = 780$ nm, trotz der verhältnismäßig geringen Werte, doch sehr deutlich. Die Steigerung liegt zwischen dem 1.6- bis 18.5-fachen.

Des Weiteren ist zu erkennen, dass der σ_2 von Cou-Br **123** eine deutliche Abhängigkeit vom Dipolmoment (Polarität) des Lösungsmittels zeigt (Tabelle 17, graue Markierung), wobei der σ_2 mit steigender Polarität zunimmt. Bei **24** ist diese Abhängigkeit weniger stark ausgeprägt.

Tabelle 17. Abhängigkeit des σ_2 vom Lösungsmittel

LSM	Dipolmoment / 10^{-3} cm	σ_2 / GM				SF ^a
		12	24	123 ($\lambda_{\text{exc}} = 780$ nm)	123 ($\lambda_{\text{exc}} = 720$ nm)	
DCM	5.17	0.01	0.16	0.26	8.58	33
DMSO	13.00	0.01	0.04	0.74	13.86	19
ACN	11.48	0.01	0.20	0.41	17.22	42

^a SF = Steigerungsfaktor zwischen **123** ($\lambda_{\text{exc}} = 780$ nm) und **123** ($\lambda_{\text{exc}} = 720$ nm)

Wie in Abbildung 101 zu erkennen ist, wird bei Cou-Br-f-DBD **127** die Donoremission (Coumarin) fast vollständig vom Akzeptor (DBD) gelöscht. Der sehr effiziente FRET ist darin begründet, dass der maximal erreichbare Abstand der Chromophore (hier 1.5 nm - 1.6 nm) weit unter dem Förster Radius R_0 für dieses FRET-Paar ($R_{0,\text{ACN}} = 4.5$ nm, $n_{\text{D,ACN}} = 1.3442$, $J = 2.01 \cdot 10^{-13}$ cm⁶, $\kappa^2 = 2/3$, $E_{\text{FRET, theor}} = 99.9\%$) liegt.^[169] Des Weiteren ist das 2P-Emissionsspektrum von Cou-Br-f-DBD **127** (braun) leicht hypsochrom verschoben.

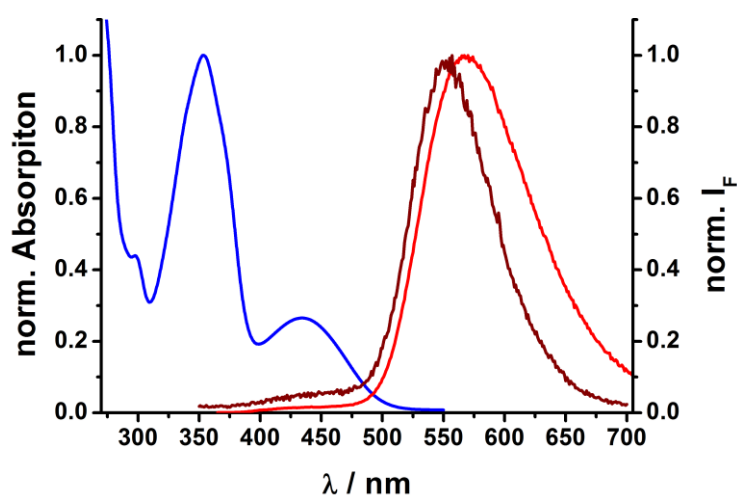


Abbildung 101. Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot, $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm) von **127** in DMSO. Der braune Graph zeigt die Emission von **127** bei $\lambda_{\text{exc}} = 780$ nm in DMSO.

4.2.2 2P-Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie

Um die Anwendbarkeit des FRET-Paares Cou-Br-f-DBD **127** zu demonstrieren, wurden von CARSTEN HILLE 2P-FLIM-Bilder aufgenommen. Dafür wurden Speicheldrüsen der Schabe *P. AMERICANA* 15 min mit einer 2 μ M-Lösung von Cou-Br-f-DBD **127** inkubiert und die röhrenförmigen Speicheldrüsen vermessen (Abbildung 102). Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wird ein Kontrast erzeugt, der die Unterscheidung zwischen Umgebung und Zielstruktur erleichtert. Die unbeladenen Speicheldrüsen zeigen eine geringe Autofluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 780 nm (Abbildung 102, Bild A, E (rot)), wie es für die 2PA erwartet wird.^[170] Lediglich die luminale Kutikula (c) und die Trachea (t) tragen zur Autofluoreszenz bei. Die Fluoreszenzlebenszeitverteilung bewegt sich um 3 ns (Abbildung 102, Bild B, F (rot)). Im Gegensatz dazu, ist die Fluoreszenzintensität der mit Cou-Br-f-DBD **127** beladenen Speicheldrüsen um ein vielfaches höher als die der unbeladenen Drüsen (Abbildung 102, Bild C, E (blau)). Die Beladungseffizienz in den Speicheldrüsen ähnelt der, bereits beschriebener Ionen-sensitiver Fluorophore.^[31,33] Das FRET-Paar Cou-Br-f-DBD **127** verteilt sich gleichmäßig in den Speicheldrüsen und akkumuliert nicht in einzelnen Zellkompartimenten. Im Zellkern (n) und im Lumen (dl) wurde keine Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 102, Bild D). Die erfolgreiche Beladung der lebenden Speicheldrüsen mit Cou-Br-f-DBD **127** konnte ebenfalls über die Fluoreszenzlebenszeitverteilung gezeigt werden, welche zu längeren Fluoreszenzlebensdauern um 5.5 ns verschoben ist (Abbildung 102, Bild D, F (blau)).

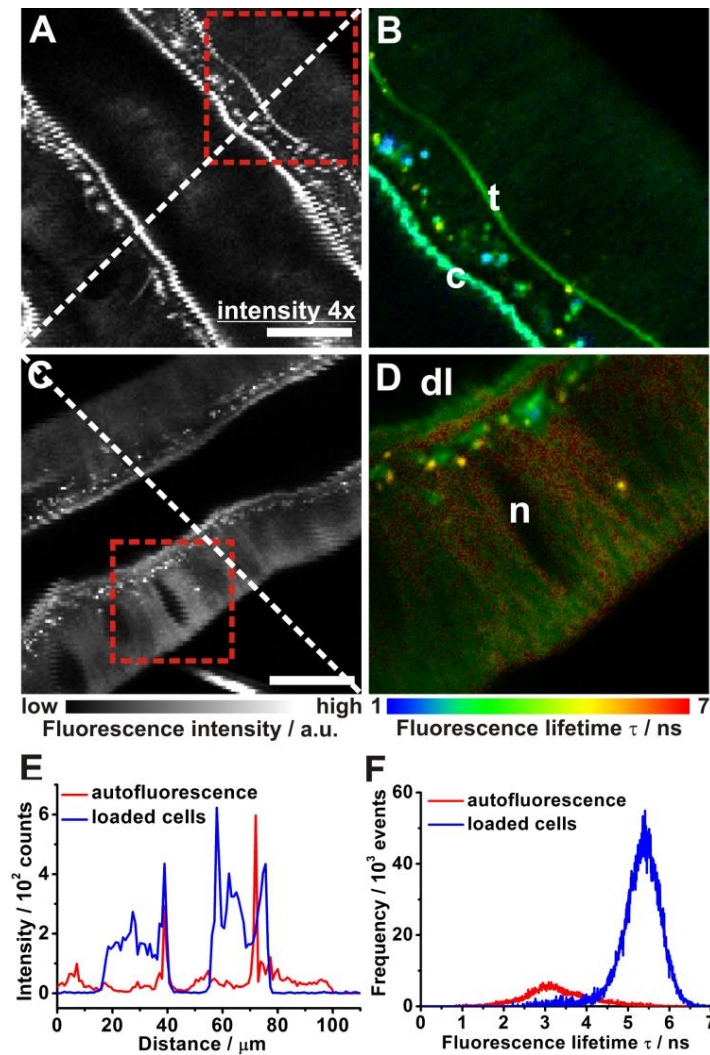


Abbildung 102. A: Intensitätsbild der Autofluoreszenz einer Speicheldrüse ($\times 4$ vergrößerte Intensität) und B: 2PA-FLIM-Bild des roten Rechtecks. C: Fluoreszenz-Intensitätsbild einer mit Cou-Br-f-DBD **127** beladenen Speicheldrüse und D: 2PA-FLIM-Bild des roten Rechtecks. Scale = 20 μm ; c = luminale Kutikula; t = Trachea; dl = Lumen; n = Kern. E: Intensitätsprofil entlang der gestrichelten Linie in A und C. F: Fluoreszenzlebenszeit-Histogramm der 2PA-FLIM-Bilder aus B und D. Die Grafik wurde der Literatur entnommen.^[169]

Des Weiteren ist zu erkennen, dass die durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer des Acyl-DBDs, der in Cou-Br-f-DBD **127** als Akzeptor fungiert, in den Speicheldrüsen ähnlich den Erwartungen recht hoch ist. Die Fluoreszenzlebensdauer in PBS beträgt für das Edukt **24** $\tau_f = 6.2$ ns. Insgesamt ist Cou-Br-f-DBD **127** gut zur Beladung von lebenden Speicheldrüsen der Schabe *P. AMERICANA* geeignet. Die Speicheldrüsen stellen ein ideales Modellsystem für FLIM-Messungen dar und es wird erwartet, dass Cou-Br-f-DBD **127** auch zur Untersuchung anderer lebender Zellen geeignet ist, was jedoch nicht weiter untersucht wurde. Um als Fluoreszenzsonde oder Biomarker eingesetzt zu werden, müsste Cou-Br-f-DBD **127** jedoch noch weiter funktionalisiert werden.

4.3 Ca²⁺-Sensoren

Ziel war es die herausragenden Eigenschaften der DBD-Farbstoffe (großer STOCKES-Shift bei gleichzeitig langer Lebensdauer) mit einem Ionensensor zu verknüpfen. Die Verwendung von individuellen Sensorfluorophoren, welche aufgrund ihres speziellen BAPTA-Grundgerüsts als selektive Ca²⁺-Sensoren dienen, haben sich in den letzten Jahren gut etabliert.^[107,108,112,121,171] Jedoch gibt es immer noch Bedarf an geeigneten Fluorophoren die für Multiplexing-Anwendungen mit anderen Sensoren kombiniert werden können. Die Ester-DBD-Fluorophore sind, aufgrund ihrer hohen Fluoreszenzlebensdauer und -quantenausbeute, besonders gut für Untersuchungen in polaren Medien geeignet. Da Ester in Zellen jedoch durch verschiedene Esterasen hydrolysiert werden können, gibt es Grund zur Annahme, dass auch die Estergruppe am DBD-Grundgerüst hydrolysiert wird. Jedoch handelt es sich hier um eine spezielle Variante, um einen vinylogenen Ester (rote Markierung, Abbildung 103), welcher durch seine angrenzenden Sauerstoffe zudem auch sterisch gehindert ist. Acyl-DBD-Fluorophore zeigen in wässrigen Medien zwar schlechtere Fluoreszenzeigenschaften, jedoch haben die Zellmessungen des 2P-FRET-Paares **127** gezeigt, dass dieser sich gut detektieren lässt. Daher wurden beide DBD-Typen für den Aufbau von Sensorfluorophoren verwendet.

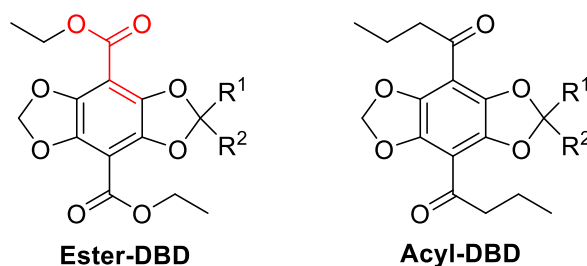


Abbildung 103. Strukturen der DBD-Bausteine.

Sensorfluorophore können über unterschiedliche Wege in die Zelle geschleust werden. Methoden wie Mikroinjektion, Iontophorese oder Diffusion über eine Patch-Clamp-Pipette können die Zellmembran beschädigen, sind aber in manchen Fällen unverzichtbar.^[172] Als eine besonders effektive Methode hat sich die nichtinvasive Einführung der Ca²⁺-Sensoren über deren veresterte Form erwiesen. Anders als bei der Ca²⁺-aktiven Form (freies Carboxylat), ist der inaktive Ester membranpermeabel und kann auf natürlichem Wege in die Zelle transportiert werden. Etabliert hat sich der Acetoxymethyl-(AM)-ester, der u.a. weitestgehend im extrazellulären Raum stabil ist und von zytosolischen Esterasen schnell erkannt wird (Abbildung 104).^[122,173,174] Wenn der lipophile AM-Ca²⁺-Sensor die Membran passiert hat, werden die Ester-Gruppen über spezifische Esterasen, unter Freisetzung von Essigsäure und Formaldehyd, hydrolysiert. Der nun freigesetzte Ionen-sensitive polyanionische Ca²⁺-Sensor kann freies zytosolisches Ca²⁺ binden und nicht mehr so einfach die Zellmembran passieren.

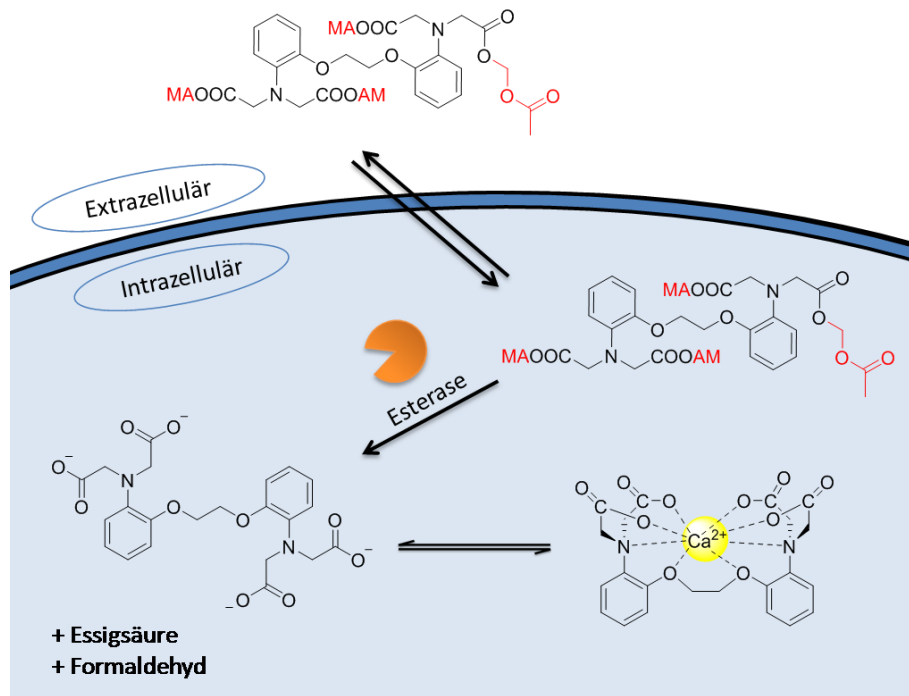


Abbildung 104. Schematische Darstellung der Beladung von Zellen mit dem Ca^{2+} -Sensor BAPTA.

4.3.1 Synthese der Ca^{2+} -Sensoren

Zur Darstellung Ca^{2+} -sensitiver BAPTA-DBD-Fluorophore sollten die in Abbildung 105 aufgeführten Ca^{2+} -Sensoren synthetisiert werden. Da bei der Verseifung der Ethylester-Gruppen des BAPTAs, die Ethylester am DBD-Gerüst ebenfalls verseift werden, sollte für spektroskopische Untersuchungen in der Küvette der Ester-DBD-Fluorophor Benzyl-geschützt werden und der BAPTA-DBD-Baustein **130** synthetisiert werden. Da es sich beim Benzylester um einen, für *in vivo* Zelluntersuchungen untypischen Ester handelt und nicht genau bekannt ist, wie gut die Hydrolyse über Esterasen erfolgt, soll **129** für Zelluntersuchungen verwendet werden. Zur vereinfachten Kennzeichnung der veresterten und der hydrolysierten bzw. hydrierten Form, erhalten letztere ein ' (z.B. **129** → **129'**). Die Fluoreszenz der BAPTA-DBD-Carboxylate sollte, wie in Kapitel 3.5 (Abbildung 32) beschrieben, über einen PET gelöscht werden. Nach der Ca^{2+} -Komplexierung wird daraufhin die Löschung (teilweise) wieder aufgehoben.

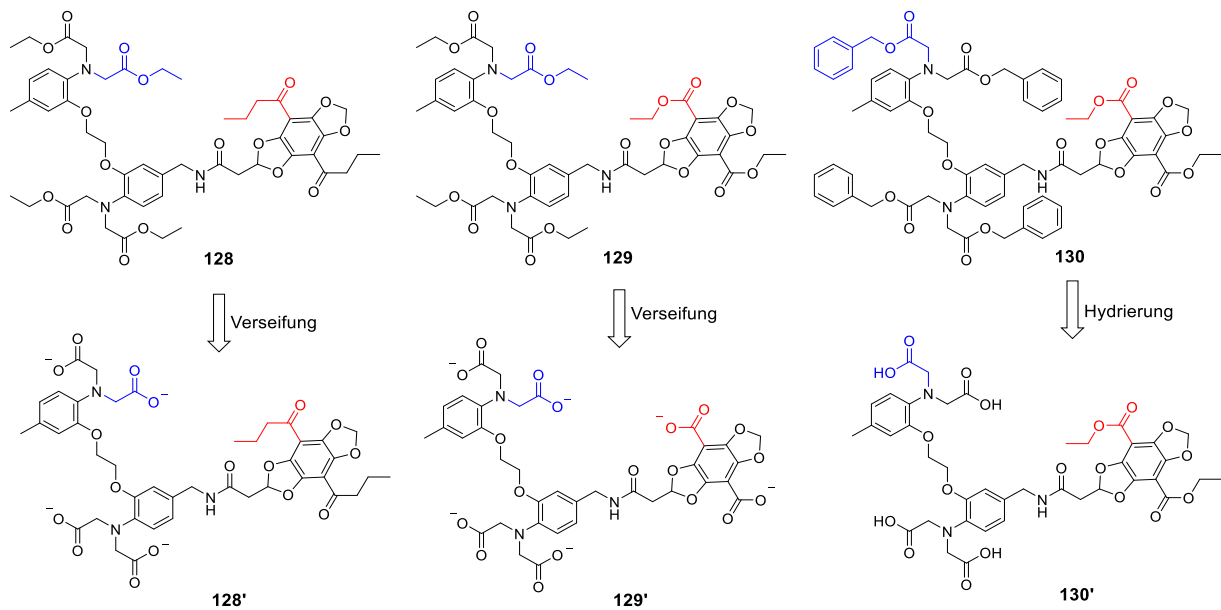


Abbildung 105. Darstellung der geplanten BAPTA-DBD-Fluorophore.

Zur Verknüpfung des DBD-Bausteins mit BAPTA wurde das Amin **138** synthetisiert (Abbildung 106). Ausgehend von 5-Methyl-2-nitrophenol (**131**) wurde über eine bekannte Syntheseroute zunächst der Aldehyd **136** hergestellt.^[109,114,115] Mittels Hydroxylammoniumchlorid wurde das Oxim **137** in sehr guter Ausbeute dargestellt. Die anschließende Reduzierung mit Zn in AcOH ergab das BAPTA-Amin **138** mit einer Ausbeute von 21% über sieben Stufen. Über das Säurechlorid **63** und **138** konnte der BAPTA-DBD-Fluorophor **128** quantitativ synthetisiert werden. Die Gesamtausbeute betrug 11% über 15 Stufen.

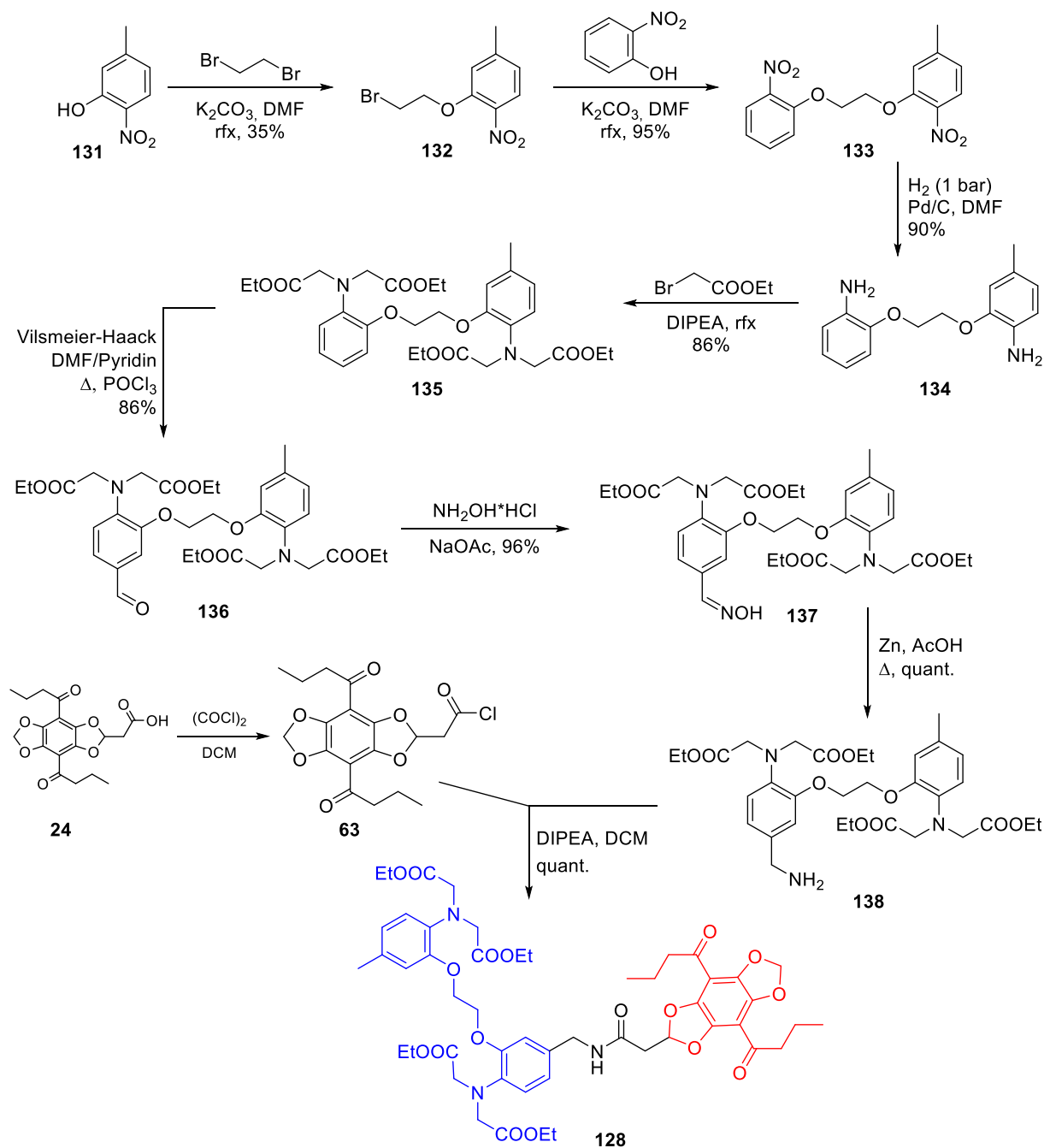


Abbildung 106. Synthese von **128**.

Der DBD-Ester wurde nach einer bekannten Syntheseroute von WESSIG *et al.* synthetisiert (Abbildung 107).^[38] Das MOM-geschützte Catechol **30** wurde di-lithiiert und mit Chlorameisensäureethylester zum BD-Ester **139** zu 75% umgesetzt. Hier kann auf die Bildung eines GILMAN-Cuprats verzichtet werden, da der entstehende Ester nicht mit überschüssigem *n*-BuLi weiterreagiert. Die Abspaltung der MOM-Schutzgruppe und die anschließende Cyclisierung mit DMAP zu **141** erfolgten in sehr guten Ausbeuten. Durch Hydrierung wurde der Ester-DBD **25** zu 92% erhalten. Insgesamt konnte **25** ausgehend von Sesamol **28** in sechs Stufen mit einer Ausbeute von 57% erhalten werden.

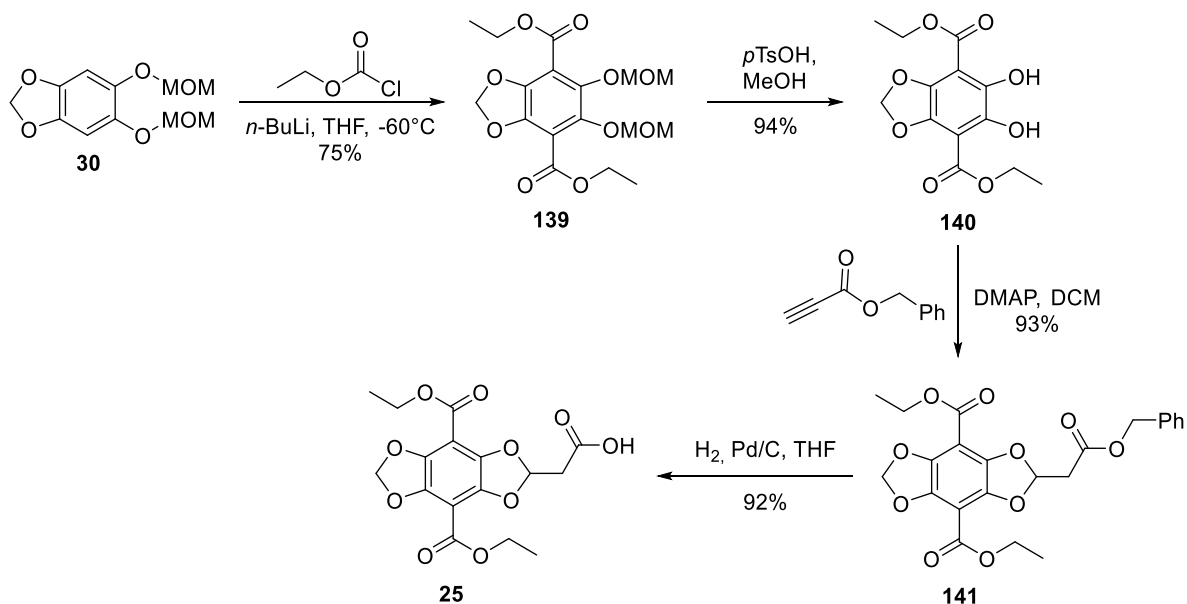


Abbildung 107. Synthese des DBD-Esters **25**.

Zur Synthese des BAPTA-DBD-Fluorophors **129**, der Ethylester-Gruppen am DBD-Gerüst trägt, wurde analog zu **128**, das Säurechlorid **142** mit dem Amin **138** umgesetzt. Die Ausbeute betrug hier 75% (Abbildung 108). Die Gesamtausbeute betrug 9% über 15 Stufen.

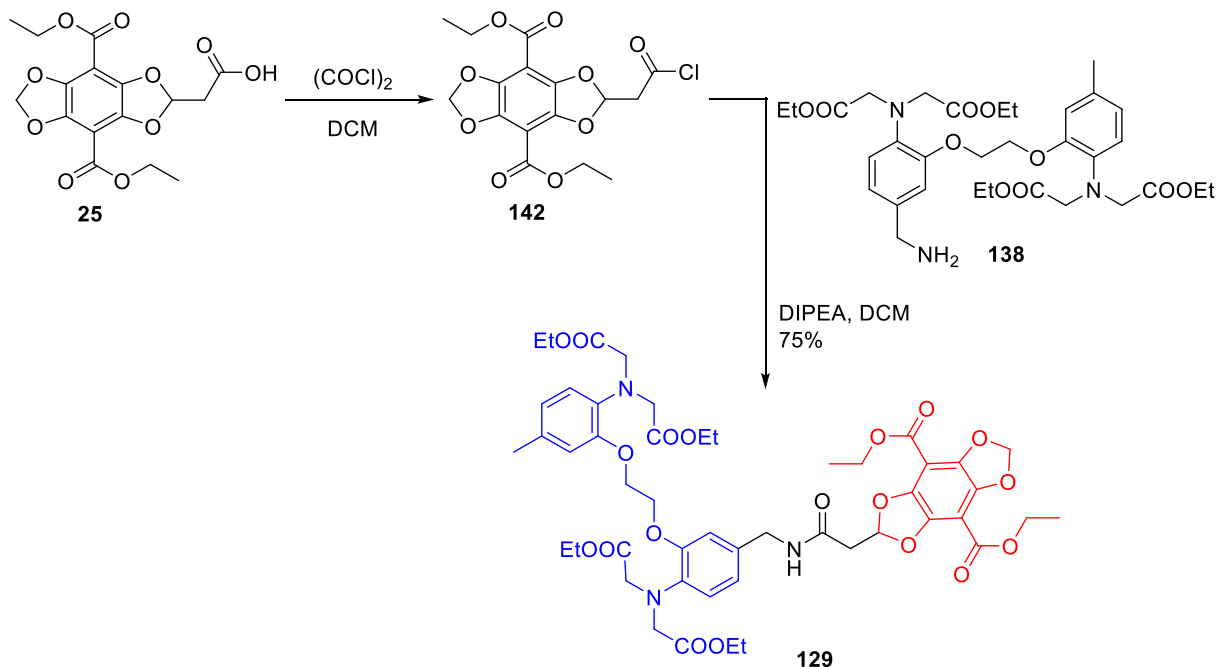


Abbildung 108. Synthese von **129**.

Zur Darstellung eines BAPTA-DBD-Fluorophors mit Benzyl-Schutzgruppen anstelle der Ethyl-Gruppen, wurde **130** synthetisiert (Abbildung 109). Ausgehend von **134** und Benzyl-2-bromacetat wurde **143** mit einer Ausbeute von 49% erhalten. Die anschließende Formylierung über VILSMEIER-HAAK ergab

den Aldehyd **144** mit 65%. Die Darstellung desamins **146** erfolgte weiterhin analog zu **128** in guten Ausbeuten. **146** wurde ausgehend von **131** über sieben Stufen mit einer Ausbeute von 7% erhalten. Der BAPTA-DBD-Fluorophor **130** konnte über die Umsetzung des Säurechlorids **142** mit dem Amin **146** mit 65% erhalten werden. Die Gesamtausbeute betrug 2.6 % über 15 Stufen.

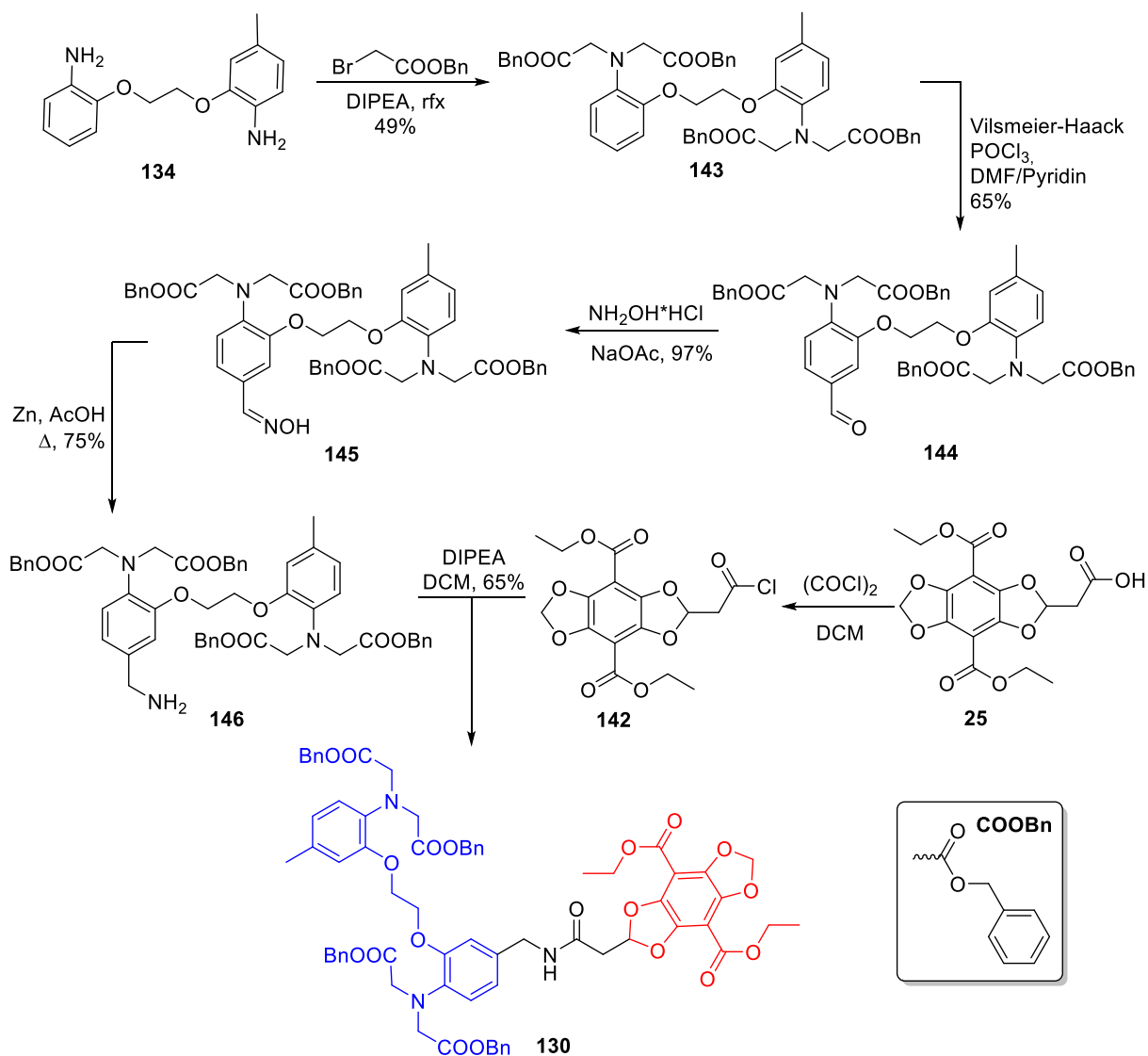


Abbildung 109. Synthese von **130**.

Zunächst wurden nur die Ethyl- bzw. Benzylester hergestellt. Die Synthese der AM-Ester sollte erst nach einigen Voruntersuchungen erfolgen. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Ethylester **128** und **129** sehr gut zellgängig sind, wodurch die Synthese der AM-Ester unnötig war.

4.3.2 Spektroskopische Eigenschaften der Ca^{2+} -Sensoren

Die drei Sensorfluorophore **128**, **129** und **130** wurden zunächst hinreichend spektroskopisch untersucht (Tabelle 18). Zum besseren Vergleich sind die DBD-Edukte **24** und **25** ebenfalls aufgeführt. Die

Absorptions- und Emissionsmaxima unterscheiden sich zwischen den BAPTA-DBD-Fluorophoren und deren DBD-Edukten nur geringfügig. Lediglich **128** zeigt in PBS einen stark ausgeprägten hypsochromen Shift von 612 nm auf 570 nm, wie es bereits bei den OSTK-Stäben der Fall war. Die Fluoreszenzabklingzeiten und -quantenausbeuten sinken für alle BAPTA-Derivate ab. Lediglich für **129** in PBS wurde eine leicht höhere Quantenausbeute (0.05) detektiert. Des Weiteren wurden in PBS ausschließlich biexponentielle Fluoreszenzabklingzeiten gemessen. Im Zusammenhang mit BAPTA ist demnach schon vor der Verseifung ein starker Löscheffekt auf die DBD-Fluoreszenz vorhanden.

Tabelle 18. Spektroskopische Eigenschaften der Sensorfarbstoffe **128**, **129**, **130** und ihren DBD-Edukten **24** und **25**

Verbindung	LM	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{a}}$ / nm	$\lambda_{\text{em}}^{\text{a}}$ / nm	$\Delta\lambda$ / nm	$\tau_{\text{F}}^{\text{b}}$ / ns	$\phi_{\text{F}}^{\text{c}}$	ϵ / $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\phi_{\text{F}} \cdot \epsilon$
24 Acyl-DBD	DMSO ^d	437	570	133	24.8	0.68	3958	2691
	PBS	448	612	164	6.2	0.01	-	-
128	CHCl ₃	434	548	114	11.9	0.31	-	-
	ACN	426	550	124	9.2	0.22	4012	883
	DMSO	433	570	137	17.5	0.49	4032	1976
	PBS	450	570	120	1.5 (60%) 6.0 (40%)	0.05	-	-
25 Ester-DBD	ACN ^d	403	495	92	15.4	0.56	4680	2621
	H ₂ O ^d	414	528	114	20.5	0.63	4947	3117
129	CHCl ₃	410	548	138	10.1	0.42	-	-
	ACN	406	495	89	7.5	0.25	4345	1086
	DMSO	406	509	103	13.05	0.55	4373	2405
	PBS	417	518	101	2.6 (77%) 10.4 (22%)	0.09	-	-
130	CHCl ₃	410	548	138	11.2	0.47	-	-
	ACN	406	495	89	7.8	0.30	5350	1605
	DMSO	406	509	103	14.12	0.66	5491	3624
	PBS	417	518	101	4.6 (70%) 14.1 (30%)	0.19	-	-

^a $\Delta\lambda = \pm 2\text{nm}$, ^b $\lambda_{\text{exc}} = 447 \text{ nm}$, ^c vermessen von URSULA EISOLD, $\Delta\phi_{\text{F}} = \pm 0.03$, ^d der Literatur entnommen^[38]

4.3.3 Ca²⁺-Kalibrierung

Um die Sensitivität dieser Art von Sensorfluorophoren bzgl. des Analyten zu charakterisieren, wird die Komplexdissoziationskonstante K_D bestimmt. Sie gibt den dynamischen Bereich an, in dem die Ca²⁺-Sensitivität des Fluorophors am größten ist. K_D entspricht der Konzentration, bei der genau die Hälfte der Sensorfluorophore in gebundener Form vorliegt. Sie variiert u.a. mit der Ionenstärke I , pH-Wert, Temperatur, Viskosität, Proteinbindung und der Anwesenheit von Mg²⁺ und anderen Ionen.^[109,175–177] Daher sind intrazellulär bestimmte K_D -Werte oft größer als deren Analoga in zellfreier Lösung.^[112] Die Ca²⁺-Affinität sinkt mit steigender Ionenstärke und steigender Temperatur. Während die Temperatur, aufgrund der geringen Reaktionsenthalpie der Komplexbildung eher einen geringen Effekt auf K_D hat, spielt der pH-Wert eine sehr entscheidende Rolle. Bei einer Änderung des pH-Wertes um 0.05 kann sich der K_D -Wert um bis zu 20% ändern.^[178–180] Der Konzentrationsempfindliche Bereich eines Ca²⁺-Sensors liegt zwischen $0.1 \cdot K_D$ - $10 \cdot K_D$.^[112] Für den Fall, dass ein Fluoreszenzfarbstoff einen $K_D = 150$ nM aufweist, kann dieser eine Änderung der Ca²⁺-Konzentration im Bereich von 15 nM - 1.5 μ M mit einer ausreichenden Änderung des Fluoreszenzsignals detektieren. Von besonderem Interesse sind Sensorfluorophore die K_D -Werte im physiologisch interessanten Ca²⁺-Bereich ($\sim 0.1 - 1.0$ μ M) aufweisen.

Herstellung der Sensorfluorophor-Stammlösung für spektroskopische *in vitro* Untersuchungen

Da **129** und **128** als Ethylester vorlagen, mussten diese zunächst über Verseifung in ihre Carboxylate überführt werden. Dazu wurden die Sensorfarbstoffe in DMSO gelöst. 0.3 M KOH-Lösung wurde zugegeben und das Gemisch für 60 min stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung mit 0.3 M HCl-Lösung neutralisiert. Die jeweiligen Mengen und Endkonzentrationen sind in Tabelle 19 dargestellt. **128** und **129** werden zu **128'** und **129'** (Carboxylate) umbenannt.

Tabelle 19. Herstellung der Sensorfarbstoff-Stammlösung zur spektroskopischen Untersuchung

Sensor	Masse / mg	DMSO / μ L	0.3 M KOH / μ L	0.3 M HCl / μ L	c (Stammlösung) / mM
128'	0.67	300	300	300	0.76
129'	1.06	332	34	34	2.70

Herstellung einer Konzentrationsreihe für *in vitro* Untersuchungen

Für die Bestimmung von K_D und weiterer spektroskopischer Kennwerte (λ_{ex} , λ_{em} , τ_F) der Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe wurden definierte Ca²⁺-Konzentrationen im nanomolaren Bereich hergestellt. Dafür wurde das kommerziell erhältliche *Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN verwendet. Dieses besteht aus einer Ca²⁺-freien Lösung (10 mM EGTA in 100 mL KCl (entspricht 10 mM K₂H₂EGTA), 30 mM MOPS, pH 7.2) und einer 39 μ M Ca²⁺-Lösung (10 mM CaEGTA in 100 mL

KCl (entspricht 10 mM $K_2CaEGTA$), 30 mM MOPS, pH 7.2). Beide Pufferlösungen wurden konzentrationsgleich mit dem jeweiligen Sensorfarbstoff versehen. Für **129'** betrug die Endkonzentration der beiden Pufferlösungen 9.6 μL und für **128'** 10.4 μL . Aus der Ca^{2+} -freien und der 39 μM Ca^{2+} -Lösung wurden insgesamt 11 unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen hergestellt (siehe Tabelle 20). Über die Komplexdissoziationskonstante von EGTA (K_D^{EGTA}) und dem Mischungsverhältnis $K_2H_2EGTA/K_2CaEGTA$ wurden die gewünschten freien Ca^{2+} -Konzentrationen mittels Gleichung 4.5 eingestellt. K_D^{EGTA} wurde entsprechend des pH-Wertes, der Temperatur und der Ionenstärke nach TSIEN *et al.* bestimmt.^[181]

$$[Ca^{2+}] = K_D^{EGTA} \cdot \frac{K_2CaEGTA}{K_2H_2EGTA} \quad (4.5)$$

Tabelle 20. Ca^{2+} -Konzentrationsreihe, Mischungsverhältnis zwischen der 10 mM K_2H_2EGTA - und der 10 mM $K_2CaEGTA$ -Pufferlösung für **128'** und **129'**. Es gilt: $I = 0.1$ mol/L und $\vartheta = 20$ °C.

128'	129'	$[Ca^{2+}] / \mu\text{M}$ für pH = 7.2, $K_D^{EGTA} = 150.5$ nM ^[30]	Mischungsverhältnis $K_2H_2EGTA / K_2CaEGTA$
•	•	0.000	10:0
	•	0.008	9.5:0.5
•	•	0.017	9:1
	•	0.027	8.5:1.5
•	•	0.038	8:2
•	•	0.065	7:3
•	•	0.100	6:4
•		0.150	5:5
•	•	0.226	4:6
•		0.351	3:7
•	•	0.602	2:8
•	•	1.355	1:9
•	•	39.000	0:10

Spektroskopische Eigenschaften von **128'** in Pufferlösung

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen von **128'** mit Ca^{2+} wurden zunächst die spektralen Eigenschaften mittels des *Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN bestimmt. In Abbildung 110 sind die Absorptionsspektren der Ca^{2+} -Konzentrationsreihe von **128'** ($[Ca^{2+}] = 0$ μM bis $[Ca^{2+}] = 39$ μM) dargestellt. Wie es zu erwarten war, steigt die Extinktion mit steigender Ca^{2+} -Konzentration an, da BAPTA Ca^{2+} bindet und der Löscheffekt minimiert wird. Die orange Kurve von $[Ca^{2+}] = 0$ μM fällt

jedoch aus der Reihe und zeigt eine erhöhte Extinktion. Im kurzwelligen Bereich bis etwa 320 nm fallen besonders die Banden a-c auf. Mit steigender Konzentration verschwindet die Bande a, wohingegen b (280 nm) erst zu entstehen scheint. C verschiebt sich infolgedessen sichtlich bathochrom (295 nm → 312 nm). In Abbildung 111 wird dieser Effekt noch einmal sehr gut deutlich. Dieses sogenannte ratiometrische Verhalten ist für einige BAPTA-Liganden typisch.^[109,182]

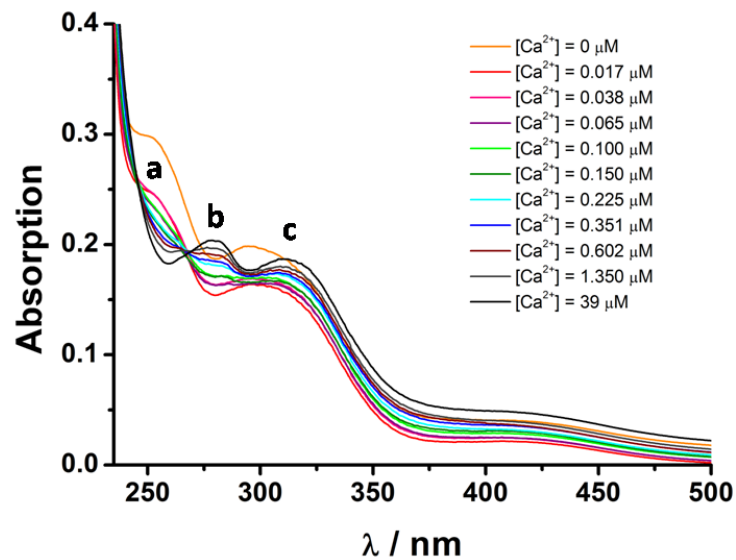


Abbildung 110. Absorptionsspektren der Ca²⁺-Konzentrationsreihe von **128'** (*Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN (9.4 μM **128'**, 30 mM MOPS, 10 mM K₂CaEGTA/ K₂H₂EGTA, *I* = 0.1 mol/L, pH = 7.2)).

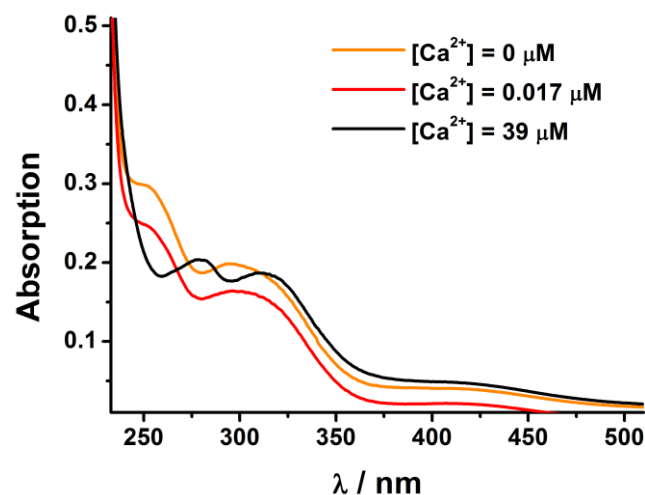


Abbildung 111. Absorptionsspektren von **128'** in Ca²⁺-freien (orange, [Ca²⁺] = 0 μM), [Ca²⁺] = 0.017 μM (rot) und Ca²⁺-gesättigten (schwarz, [Ca²⁺] = 39 μM) Calcium Kalibrierpuffer (*Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN (9.4 μM **128'**, 30 mM MOPS, 10 mM K₂CaEGTA/K₂H₂EGTA, *I* = 0.1 mol/L, pH = 7.2)).

Vergleicht man die Absorptions- und Emissionsspektren von **128** mit dessen Carboxylat **128'** so erkennt man im Absorptionsspektrum leichte Unterschiede (Abbildung 112). Die langwelligste DBD-Absorptionsbande ($\lambda = 455 \text{ nm}$) verschwindet bei **128'**. Stattdessen erscheint eine dazu hypsochrom verschobene neue Absorptionsbande bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ (**128'**). Die Absorptionsbanden im kurzwelligen Bereich sind ebenso leicht zueinander verschoben (A). In den Emissionsspektren (B) ist ebenfalls ein hypsochromer Shift ($569 \text{ nm} \rightarrow 554 \text{ nm}$) von **128** zu **128'** vorhanden. Außerdem ist hier, aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität, deutlich der Ramanpeak zu erkennen.

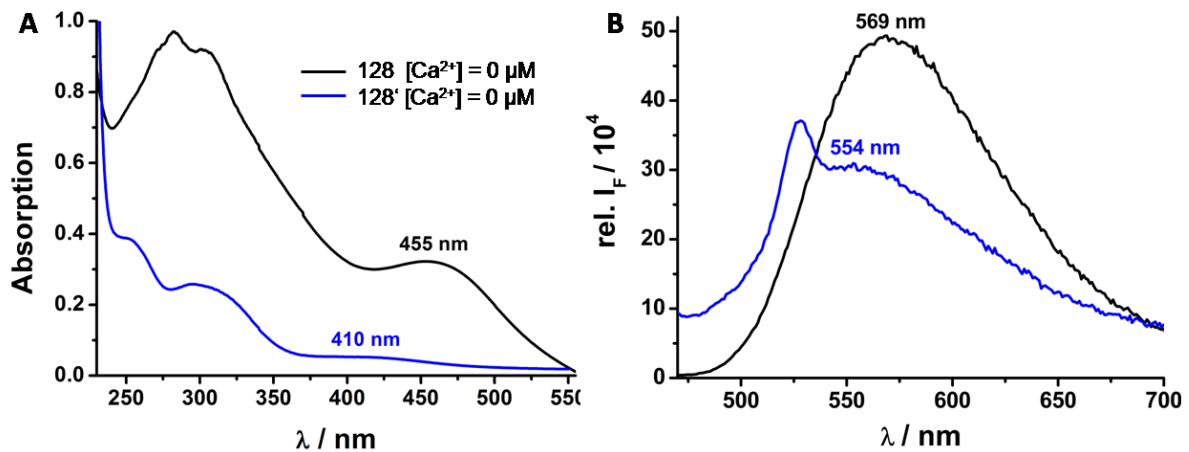


Abbildung 112. A: Absorptionsspektren und B: Fluoreszenzemissionsspektren I_F von **128** (Ester, schwarz, $\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm}$) und **128'** (Carboxylat, blau, $\lambda_{\text{ex}} = 446 \text{ nm}$) in Ca^{2+} -freiem ($[\text{Ca}^{2+}] = 0 \mu\text{M}$) Calcium-Kalibrierpuffer (*Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN (30 mM MOPS, 10 mM $\text{K}_2\text{CaEGTA}/ \text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$, $I = 0.1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7.2$)). Vermessen bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen.

In Abbildung 113 sind die Fluoreszenzemissionsspektren von **128'** in Ca^{2+} -freiem und Ca^{2+} -gesättigtem Calcium-Kalibrierpuffer dargestellt.

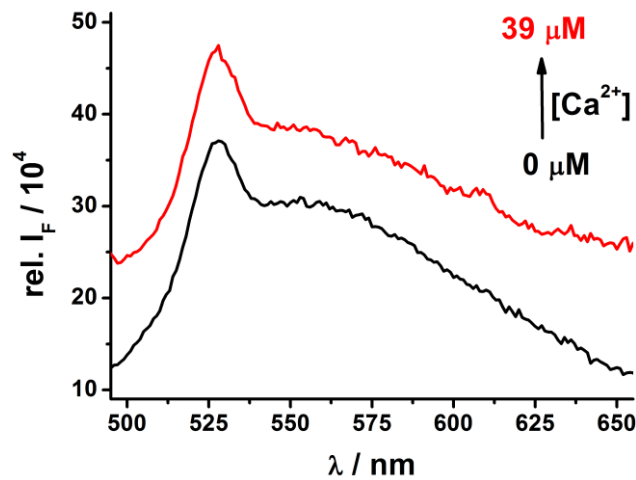


Abbildung 113. Fluoreszenzemissionsspektren I_F ($\lambda_{ex} = 446$ nm) von **128'** in Ca^{2+} -freien (schwarz, $[\text{Ca}^{2+}] = 0 \mu\text{M}$) und Ca^{2+} -gesättigten (rot, $[\text{Ca}^{2+}] = 39 \mu\text{M}$) Calcium Kalibrierpuffer (*Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN (9.4 μM **128'**, 30 mM MOPS, 10 mM $\text{K}_2\text{CaEGTA}/\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$, $I = 0.1$ mol/L, pH = 7.2)).

Die zu erwartende Zunahme der Fluoreszenzintensität, mit steigender Ca^{2+} -Konzentration, ist zwar zu erkennen, jedoch ist diese sehr gering. Typische Fluoreszenzintensitätssteigerungen liegen zwischen dem 15- bis 20-fachen oder höher.^[31] Da die Fluoreszenzintensität für **128'** insgesamt sehr niedrig ist, können die Spektren nicht gut ausgewertet werden.

Spektroskopische Eigenschaften von **129'** in Pufferlösung

In Abbildung 114 sind die Absorptions- und Emissionsspektren von **129'** in Ca^{2+} -freien ($[\text{Ca}^{2+}] = 0 \mu\text{M}$) und Ca^{2+} -gesättigten ($[\text{Ca}^{2+}] = 39 \mu\text{M}$) Ca^{2+} -Kalibrierpuffer dargestellt. Verbindung **129'** zeigt eine Absorptionsbande bei $\lambda_{ex} = 354$ nm und eine breite Fluoreszenzemission bei $\lambda_{em} = 547$ nm. Eine steigende Ca^{2+} -Konzentration führt zur Intensitätserhöhung der Absorption und der Fluoreszenzintensität I_F (1.3-fache). Der molare, dekadische Extinktionskoeffizient beträgt für $\lambda_{ex} = 354$ nm $\epsilon \sim 4181 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bei der Ca^{2+} -freier Form und $\epsilon \sim 5162 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bei der Ca^{2+} -gesättigten Form. Im Vergleich zu gängigen Ca^{2+} -Sensoren sind die Extinktionskoeffizienten von **129'** sehr klein.^[31] Da die spektrale Lage und das Aussehen der Absorptions- und Emissionsspektren nicht von der Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst werden, handelt es sich bei **129'** um einen nicht-ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff.^[177]

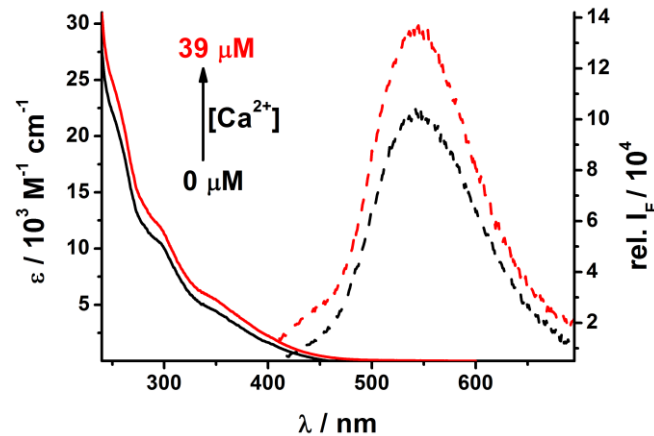


Abbildung 114. Absorptionsspektren (kompakt) und relative Fluoreszenzemissionsspektren I_F (gestrichelt, $\lambda_{\text{ex}} = 354 \text{ nm}$) von **129'** in Ca^{2+} -freiem (schwarz, $[\text{Ca}^{2+}] = 0 \mu\text{M}$) und Ca^{2+} -gesättigtem (rot, $[\text{Ca}^{2+}] = 39 \mu\text{M}$) Calcium Kalibrierpuffer (*Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN (9.4 μM **129'**, 30 mM MOPS, 10 mM $\text{K}_2\text{CaEGTA}/\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$, $I = 0.1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7.2$)).

Vergleicht man die Emissionsbanden von **129** und **129'** im Ca^{2+} -Kalibrierpuffer, so zeigt sich, dass **129'** leicht bathochrom verschoben ($\Delta\lambda = 27 \text{ nm}$) wird (Abbildung 115 - B). Im Absorptionsspektrum von **129'** (Abbildung 115 - A) verschwindet die langwelligste Absorptionsbande von **129** ($\lambda = 433 \text{ nm}$), wie bereits bei **128/ 128'** beobachtet. Stattdessen taucht bei $\lambda = 345 \text{ nm}$ eine dazu hypsochrom verschobene Absorptionsbande auf ($\Delta\lambda = 79 \text{ nm}$). Im kurzwelligen Absorptionsbereich ($\lambda \leq 300 \text{ nm}$) sind die Banden ebenfalls leicht hypsochrom zu denen in **129** verschoben.

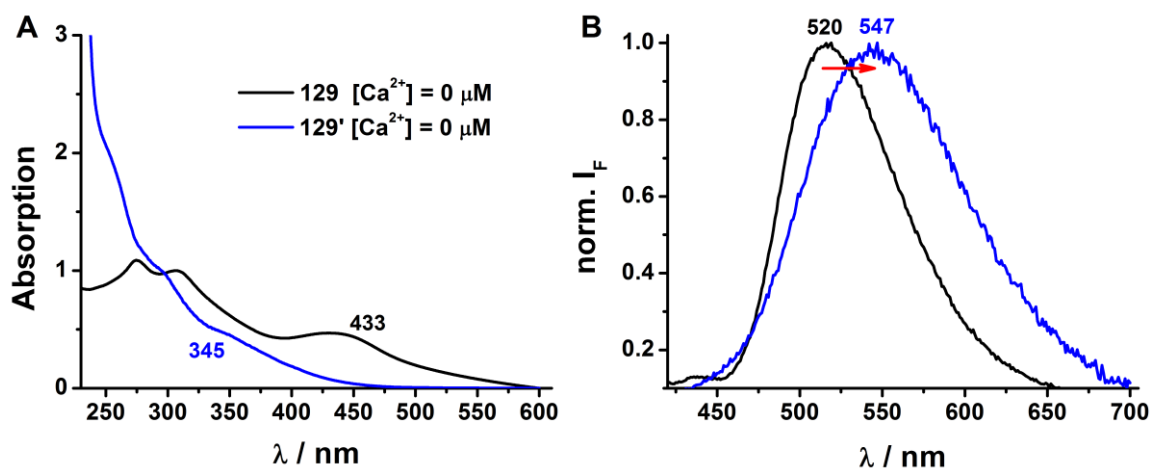


Abbildung 115. A: Absorptionsspektren und B: normierte Fluoreszenzemissionsspektren I_F von **129** (Ester, schwarz, $\lambda_{\text{ex}} = 433 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) und **129'** (Caboxylat, blau, $\lambda_{\text{ex}} = 354 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 547 \text{ nm}$) in Ca^{2+} -freiem ($[\text{Ca}^{2+}] = 0 \mu\text{M}$) Calcium-Kalibrierpuffer (*Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN (30 mM MOPS, 10 mM $\text{K}_2\text{CaEGTA}/\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$, $I = 0.1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7.2$)). Vermessen bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen.

Jedoch ist im Falle der *in vitro* Kalibrierung nicht geklärt, ob der DBD-Baustein von **129'** verseift wurde oder nicht, wie es in Abbildung 116 dargestellt ist. Die Verseifung erfolgte relativ mild, jedoch war KOH im Überschuss vorhanden, weshalb der DBD-Fluorophor sehr wahrscheinlich verseift wurde.

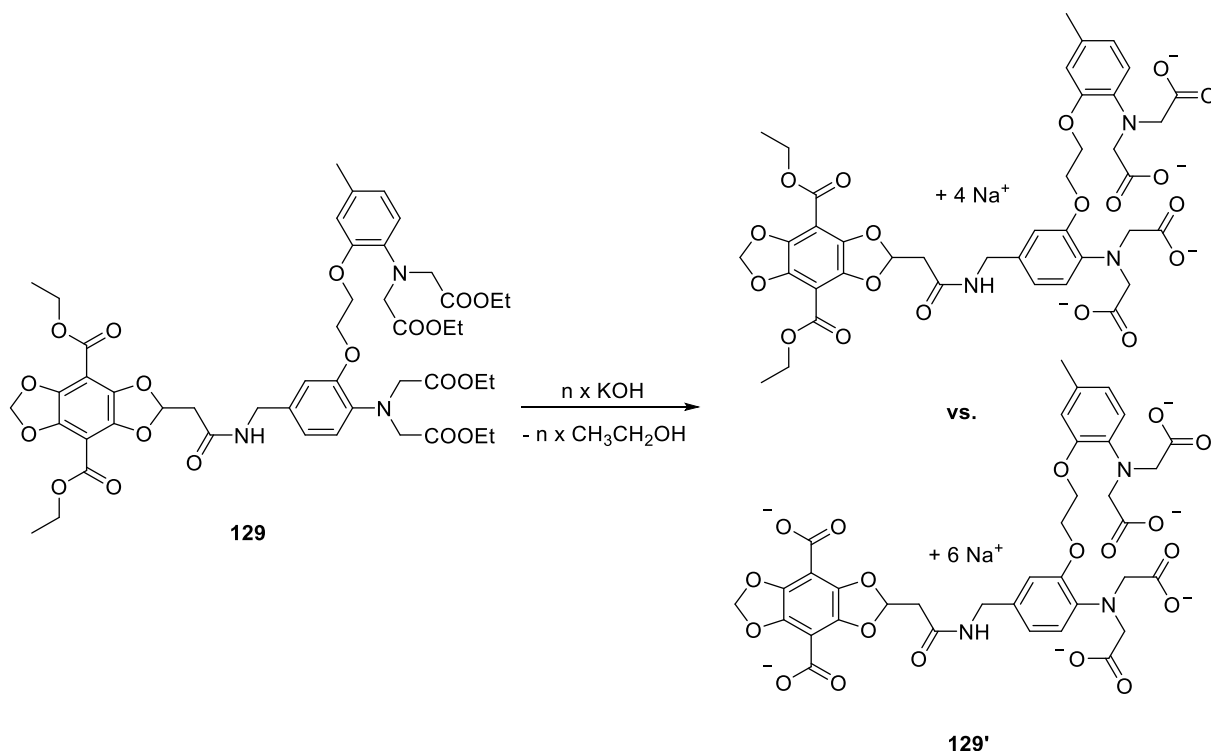


Abbildung 116. Verseifung von **129**.

Die reine DBD-Säure **147** absorbiert in PBS bei $\lambda_{\text{abs}} = 416 \text{ nm}$ und emittiert bei $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ (Abbildung 117), was sich auch nicht direkt mit den gemessenen Werten von **129'** deckt. Jedoch wurden auch bei **128'** Verschiebungen in den Absorptions- und Emissionsbanden gemessen.

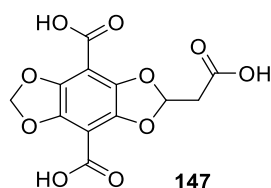


Abbildung 117. DBD-Säure **147**.

Daher kann der im Folgenden ermittelte K_D -Wert vom tatsächlichen K_D -Wert abweichen. Das Problem sollte über den Fluorophor **130** umgangen werden. Da sich der Benzylester über Hydrierung abspalten lässt und die Ethylestergruppen am DBD-Gerüst intakt bleiben. Die Hydrierung des Ester-DBD-Fluorophors erfolgt in Ethylacetat (EE). Da in anderen Lösungsmittel (z.B. THF, MeOH) zu viele Nebenreaktionen ablaufen. Um sicherzustellen, dass eine 4-fach Hydrierung des COOBn-geschützten BAPTA-Bausteins in EE in einer kurzen Zeitspanne (ca. 24 h) möglich ist, wurde **143** mit 10%igem

Pd/C unter H₂-Atmosphäre (1 bar) hydriert. Der Baustein **143** ließ sich in wenigen Stunden (3 h) vollständig hydrieren (Abbildung 118).

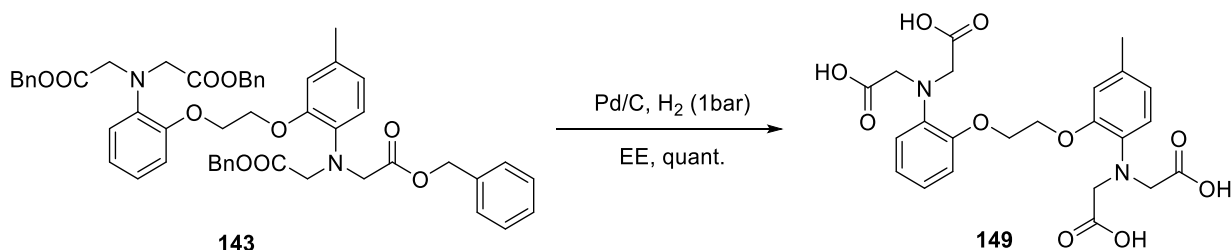


Abbildung 118. Hydrierung von **143**.

Die Hydrierung von **130** stellte sich jedoch komplizierter dar (Abbildung 119). Das Edukt konnte nicht vollständig hydriert werden und es entstanden viele Teil-hydrierte Zwischenprodukte. Auch der Austausch des Lösungsmittels (von EE zu MeOH) konnte das Problem nicht beheben. Weshalb sich die Hydrierung als ungeeignet darstellte. Durch Erhöhung des H₂-Drucks könnte das Problem eventuell gelöst werden. Die Hydrierung wurde nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde das Augenmerk auf die allgemeine Anwendbarkeit von **128** und **129** gelegt.

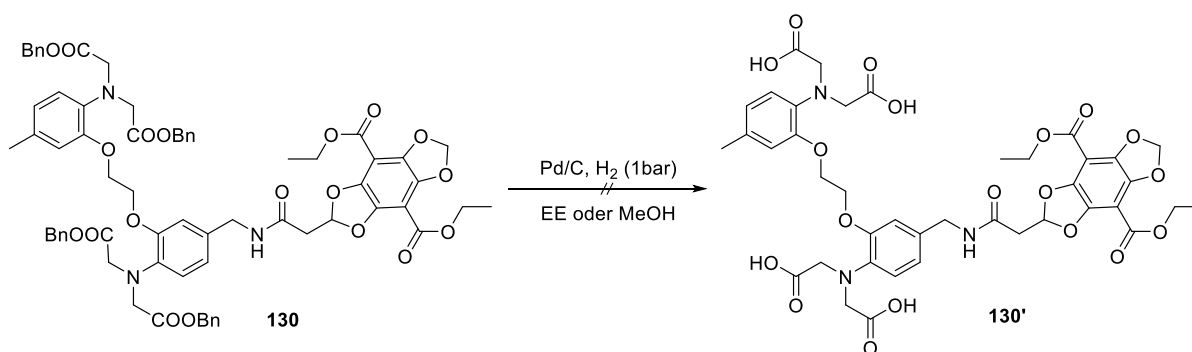


Abbildung 119. Hydrierung von **130**.

Betrachtet man die Fluoreszenzabklingzeiten von **129'** in Abbildung 120 für Ca²⁺-freie (0 μM) und Ca²⁺-gesättigte (39 μM) Bedingungen, so zeigt sich auch hier, dass eine Abhängigkeit besteht. Die Fluoreszenzabklingzeit nimmt mit steigender Ca²⁺-Konzentration zu, wie es zu erwarten war. Anhand der Abklingkurven ist zu erkennen, dass es sich nicht um einen monoexponentiellen Abfall handelt. Näheres wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

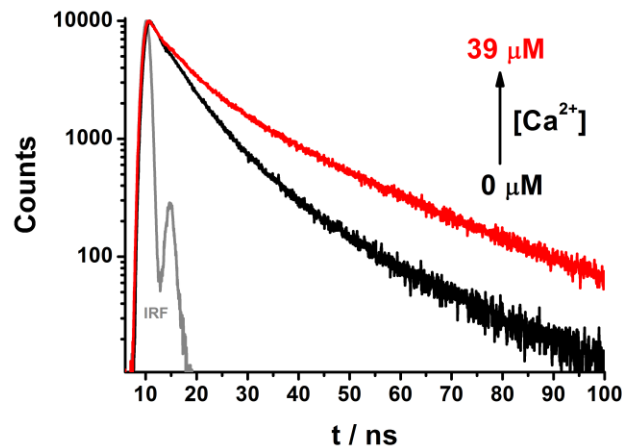


Abbildung 120. Fluoreszenzabklingkurven von **129'** (9.4 μM, $\lambda_{\text{exc}} = 372$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm) in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}^{2+}]$ (schwarz: $[\text{Ca}^{2+}] = 0$ μM, rot: $[\text{Ca}^{2+}] = 39$ μM), IRF: instrument response function (grau).

Bestimmung der Komplexdissoziationskonstante K_D

Zur Bestimmung der K_D von **128'** und **129'** wurden die Ca^{2+} -Konzentrationsreihen am FLIM-Mikroskop MICROTIME200 zeitaufgelöst vermessen. Dabei wurde festgestellt, dass sich **128'** nicht ordentlich vermessen lässt, da die Fluoreszenz im wässrigen Medium zu stark gelöscht wird. Aufgrund dessen konnte für **128'** kein K_D -Wert bestimmt werden. In Abbildung 121 und Tabelle 21 sind die Ergebnisse der globalen bi- bzw. triexponentiellen Dekonvolutions-Analyse der Fluoreszenzabklingzeiten mittels FAST-Software von **129'** dargestellt.

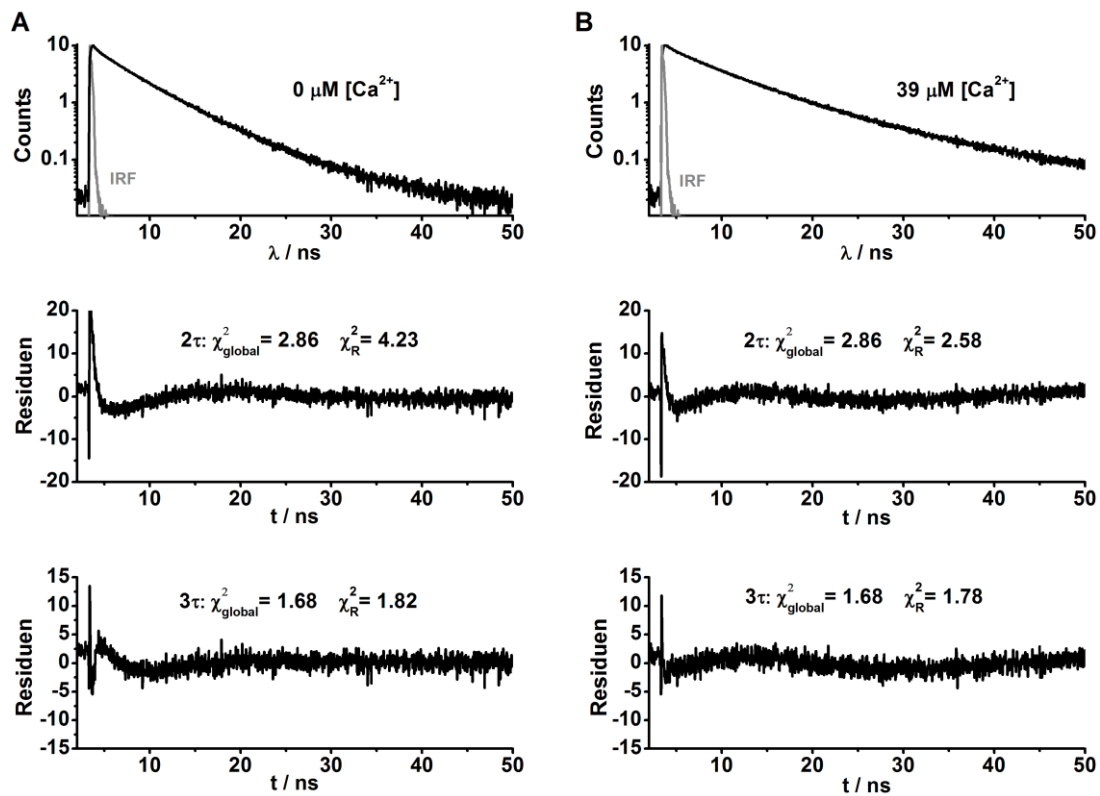


Abbildung 121. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen von **129'** am MICROTOME200. Fluoreszenzabklingkurven ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 430 \text{ nm}$) von **129'** in A: Ca^{2+} -freier ($[\text{Ca}^{2+}] = 0 \text{ }\mu\text{M}$) und B: Ca^{2+} -gesättigter ($[\text{Ca}^{2+}] = 39 \text{ }\mu\text{M}$) Pufferlösung, sowie die Ergebnisse der globalen Dekonvolutions-Analyse mittels FAST-Software; Residuen und χ^2 -Werte der bi- (2τ) und triexponentiellen (3τ) Anpassung. Die Messungen wurden im *Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN ($10.4 \text{ }\mu\text{M}$ **129'**) durchgeführt. IRF: instrument response function (hellgrau).

Tabelle 21. Fluoreszenzabklingzeiten und normierte Amplituden von **129'** in Ca^{2+} -freier ($[\text{Ca}^{2+}] = 0 \text{ }\mu\text{M}$) und Ca^{2+} -gesättigter ($[\text{Ca}^{2+}] = 39 \text{ }\mu\text{M}$) Pufferlösung. Die Bedingungen entsprechen denen aus Abbildung 121.

0 μM [Ca^{2+}]			39 μM [Ca^{2+}]			0 μM [Ca^{2+}]			39 μM [Ca^{2+}]		
	τ / ns	α / %		τ / ns	α / %		τ / ns	α / %		τ / ns	α / %
1	4.13	82.70	1	4.13	39.30	1	0.31	4.30	1	0.31	1.39
2	10.71	17.30	2	10.71	60.70	2	4.52	85.64	2	4.52	44.66
						3	11.52	10.06	3	11.52	53.95

Bei der globalen Dekonvolutions-Analyse wird auf alle 11 Fluoreszenzabklingkurven der Ca^{2+} -Konzentrationsreihe die gleiche Anpassungsfunktion angewendet, sodass die Fluoreszenzabklingzeit für den gesamten Datensatz identisch ist. Man unterscheidet zwischen reduzierten (χ_R^2) und globalen (χ_{global}^2) χ^2 -Werten. Während χ_R^2 die Güte der Anpassung einer einzelnen Fluoreszenzabkling-

kurve darstellt, stellt χ_{global}^2 die Güte der Anpassung aller Fluoreszenzabklingkurven der Ca^{2+} -Konzentrationsreihe dar. Da die globale monoexponentielle Anpassung sehr stark schwankende Residuen zeigte, wird diese hier nicht dargestellt. Die globale biexponentielle Anpassung in Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -gesättigtem Puffer zeigt einen χ_{global}^2 -Wert von 2.86. Dieser verringerte sich durch globale triexponentielle Anpassung der Kurvenschar auf 1.68. Über die globale biexponentielle Anpassung der Abklingkurven erhält man die Lebenszeitkomponenten 4.13 ns und 10.71 ns. Anhand der Amplituden α kann die Änderung der Lebenszeiten verfolgt werden. Mit steigender Ca^{2+} -Konzentration sinkt die Amplitude der kurzen Lebenszeitkomponente, während die Amplitude der langen Lebenszeitkomponente steigt (siehe Tabelle 21). Demnach entspricht die kurze Lebenszeit ($\tau_F = 4.13$ ns) der Ca^{2+} -freien Form und die lange Lebenszeit ($\tau_F = 10.71$ ns) der Ca^{2+} -gebundenen Form. Werden die Abklingkurven global triexponentiell angepasst, erhält man die drei Lebenszeitkomponenten 0.31 ns, 4.52 ns und 11.52 ns, wobei die Amplituden der beiden kurzen Lebenszeitkomponenten ($\tau_F = 0.31$ ns, $\tau_F = 4.52$ ns) mit steigender Ca^{2+} -Konzentration sinken und die Amplitude der langen Lebenszeitkomponente ($\tau_F = 11.52$ ns) steigt. Demnach handelt es sich bei der langen Lebenszeitkomponente um die Ca^{2+} -gebundene Form und bei einer der kurzen Lebenszeitkomponenten um die Ca^{2+} -freie Form.^[80] Der photophysikalische Ursprung der zweiten kurzen Lebenszeitkomponente wirft jedoch Fragen auf. Hierbei könnte es sich um Farbstoffaggregate oder Verunreinigungen handeln, wie es bereits für andere Ca^{2+} -sensitive Fluorophore vermutet wurde.^[183,184] Diese Aussage muss jedoch durch weitere spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Zur Bestimmung der K_D wurde im Folgendem die biexponentielle Abklingfunktion verwendet, deren Residuen ebenfalls im aussagekräftigen Bereich liegen.^[31] Zur Berechnung der K_D wird für die biexponentiellen Fluoreszenzabklingkurven eine mittlere Fluoreszenzabklingzeit berechnet. Dabei kann die intensitäts-gewichtete ($\tau_{F,int}$) oder die amplituden-gewichtete ($\tau_{avg,amp}$) Fluoreszenzabklingzeit bestimmt werden.^[185] Die intensitäts-gewichtete mittlere Fluoreszenzabklingzeit wird lediglich bei dynamischer Fluoreszenzlöschung berechnet.^[34] Daher wird im Folgenden die amplituden-gewichtete mittlere Fluoreszenzabklingzeit bestimmt, die gängigerweise für multiexponentielle Abklingkurven genutzt wird. Hierfür wird zunächst der Anteil α_i der Lebenszeitkomponenten an der Fluoreszenzabklingkurve nach Gleichung 4.6 bestimmt. A_i entspricht der Amplitude.

$$\alpha_i = \frac{A_i}{\sum A_j} \quad (4.6)$$

Die amplituden-gewichtete mittlere Fluoreszenzabklingzeit berechnet sich aus der Summe der relativen Anteile α_j und der entsprechenden Fluoreszenzabklingzeit τ_j nach Gleichung 4.7:

$$\tau_{avg,amp} = \sum \alpha_j \tau_j \quad (4.7)$$

Da der Anteil der langen Lebenszeitkomponente ($\tau_F = 10.71$ ns) mit steigender Ca^{2+} -Konzentration zunimmt, steigt auch die amplituden-gewichtete mittlere Fluoreszenzabklingzeit $\tau_{\text{avg,amp}}$ an. In Abbildung 123 ist der Verlauf dargestellt. Die K_D lässt sich nach Gleichung 4.9 berechnen und kann durch Umstellung von Gleichung 4.8, der Berechnung der freien Analytkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]$, erhalten werden. Dabei entspricht v der Fluoreszenzabklingzeit (bzw. Fluoreszenzintensität). Das Subskript *min* steht für Ca^{2+} -freie und *max* für Ca^{2+} -gesättigte Messbedingungen. [80,186]

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot \frac{v - v_{\text{min}}}{v_{\text{max}} - v} \quad (4.8)$$

$$v = \frac{K_D \cdot v_{\text{min}} + v_{\text{max}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{K_D + [\text{Ca}^{2+}]} \quad (4.9)$$

Nach Anpassung der Datenpunkte der $\tau_{\text{avg,amp}}$ nach Gleichung 4.9 wurde eine Komplexdissoziationskonstante K_D von (130 ± 5) nM erhalten. Diese liegt im physiologisch interessanten $[\text{Ca}^{2+}]$ -Bereich, weshalb **129'** potentiell für entsprechende Zellmessungen geeignet wäre.^[115] Da der Ester **129** im Puffer bereits zwei Fluoreszenzlebensdauern ($\tau_F = 2.6$ ns und 10.4 ns) aufweist, ist es nicht überraschend das die normalisierten Amplituden α_i nicht die Werte 1 und 0 in Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -gesättigtem Puffer erreichen.

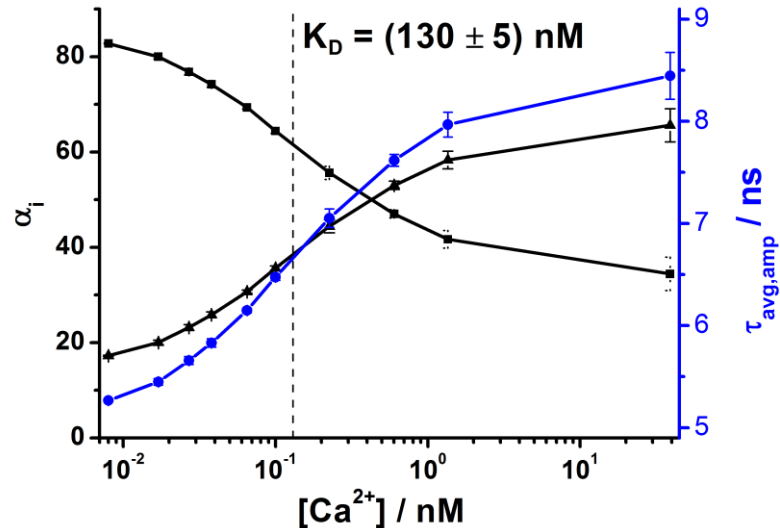


Abbildung 122. Normierte Amplituden α_i (schwarz) und die amplituden-gewichtete mittlere Fluoreszenzabklingzeit $\tau_{\text{avg,amp}}$ (blau) in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration. Die Vierecke entsprechen den normierten Amplituden der kurzen Lebenszeitenkomponente ($\tau_F = 4.13$ ns) und die Dreiecke den normierten Amplituden der langen Lebenszeitenkomponente ($\tau_F = 10.71$ ns) ($\text{MW} \pm \text{SE}$, $n = 3$). Die Lage von K_D wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

Die ermittelten spektroskopischen Kenndaten wurden in Tabelle 22 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 22. Spektroskopische Kenndaten von **129'** (vermessen im *Calcium Calibration Buffer Kit #1* von INVITROGEN (30 mM MOPS, 10 mM K₂CaEGTA/K₂H₂EGTA, *I* = 0.1 mol/L, pH = 7.2)).

	Farbstoff-Form	
	Ca ²⁺ -frei	Ca ²⁺ -gebunden
$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$		354
$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$		547
$\varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	4181	5162
$\tau_{\text{F}} / \text{ns}$	4.13	10.71
K_{D} / nM	(130 ± 5)	

4.3.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen *in vivo*

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Ca²⁺-sensitiven Fluorophore in physiologischer Umgebung wurden die Speicheldrüsen der Schabe *P. AMERICANA* verwendet. Die präparierten Speicheldrüsen wurden in einer physiologischen Nährlösung, der sogenannten Ringerlösung (isotonisch, 2 mM CaCl₂ · 2 H₂O, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 160 mM NaCl, 10 mM TRIS, 10 mM Glucose · H₂O, pH = 7.4 über 1 M HCl) überführt.^[126] Die Inkubation der Speicheldrüsen mit dem Ca²⁺-sensitiven Fluorophor erfolgte in einem Blockschälchen im Dunkeln auf einer Rüttelplatte bei Raumtemperatur. Nach einer definierten Inkubationszeit (folgen im weiteren Text) wurden die beladenen Speicheldrüsen in Fluorophor-freie Ringerlösung getaucht und in einer Perfusionswanne (*V* ~ 2 mL) fixiert. Die Perfusionswanne besteht aus einem Deckglas und einem Kunststoffrand mit Zu- und Abflussschläuchen. Darüber wurden die Speicheldrüsen kontinuierlich mit Ringerlösung (u.a. mit Additiven) versorgt. Die Durchflussrate wird über eine Perfusionspumpe geregelt. In Abbildung 123 sind die Fluoreszenzintensitätsbilder eines mit **129'** beladenen (B) und unbeladenen (A) Ausführgangs der Speicheldrüsen dargestellt. Die darunterliegenden Graphen stellen das Profil der Fluoreszenzintensitäten entlang der weißen Linien dar. Die beladenen Zellen (B) zeigen eine etwa 4-5-fach höhere Fluoreszenzintensität, als die Autofluoreszenz der Zellen. Die einzelnen Zellkompartimente wurden bereits im Kapitel 4.2.2 benannt. Der Fluoreszenzfarbstoff **129'** verteilt sich gleichmäßig in den Zellen, akkumuliert nicht und geht nicht in das Lumen und den Zellkern, wie es für einen standardmäßigen Sensorfluorophor üblich ist.

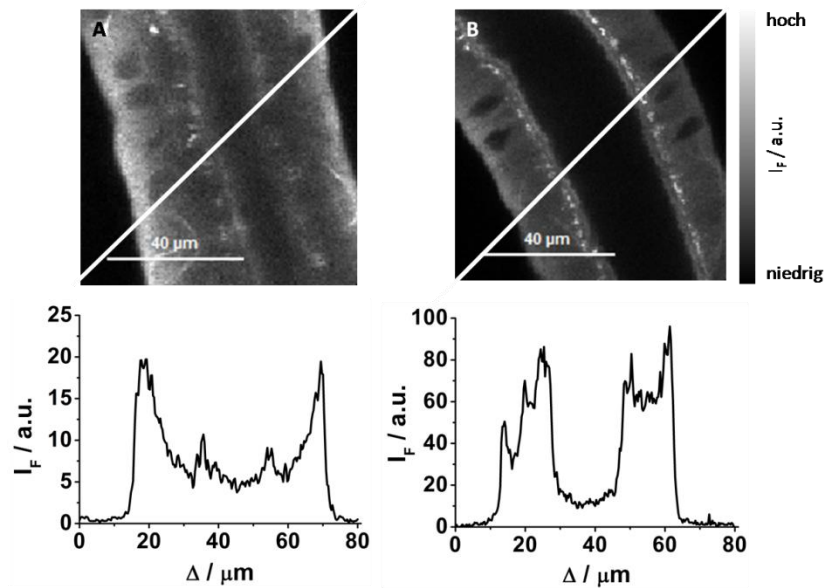


Abbildung 123. Beladung der Speicheldrüsen mit $129'$. Fluoreszenzintensitätsbilder I_F ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 430 \text{ nm}$) eines A: unbeladenen und B: $129'$ -beladenen Ausführgangs der Speicheldrüsen der Schabe *P. AMERICANA*. Die Fokusebene schneidet die Ausführgänge medial. Die darunter liegenden Graphen stellen das Profil der Fluoreszenzintensitäten entlang der weißen Linien dar.

Die Dauer fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wird u.a. durch Photobleichen und Farbstoffextrusion limitiert, wobei es zur Abnahme des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses kommt. Extrusion kann durch passive oder auch aktive Transportprozesse der Zellen erfolgen, wobei der Farbstoff vom Zytosol in das extrazelluläre Medium geleitet wird. Um den Einfluss der Farbstoffextrusion einzuschätzen, wurden bei gleicher Laserleistung in einem Zeitabstand von 15 min FLIM-Bilder aufgenommen (siehe Abbildung 124, A). Die Farbstoffextrusion ist in den ersten 15 min besonders stark (Verlust von 29%) und fällt danach nur noch moderat ab. Innerhalb von 75 min wurde ein Farbstoffverlust von 65% beobachtet. Die Countraten der Fluoreszenzabklingkurven waren jedoch auch nach 75 min unter diesen Messbedingungen noch ausreichend gut zur Bestimmung der Fluoreszenzabklingzeiten (B). Die Stärke des Bleich-Effekts wurde nicht untersucht.

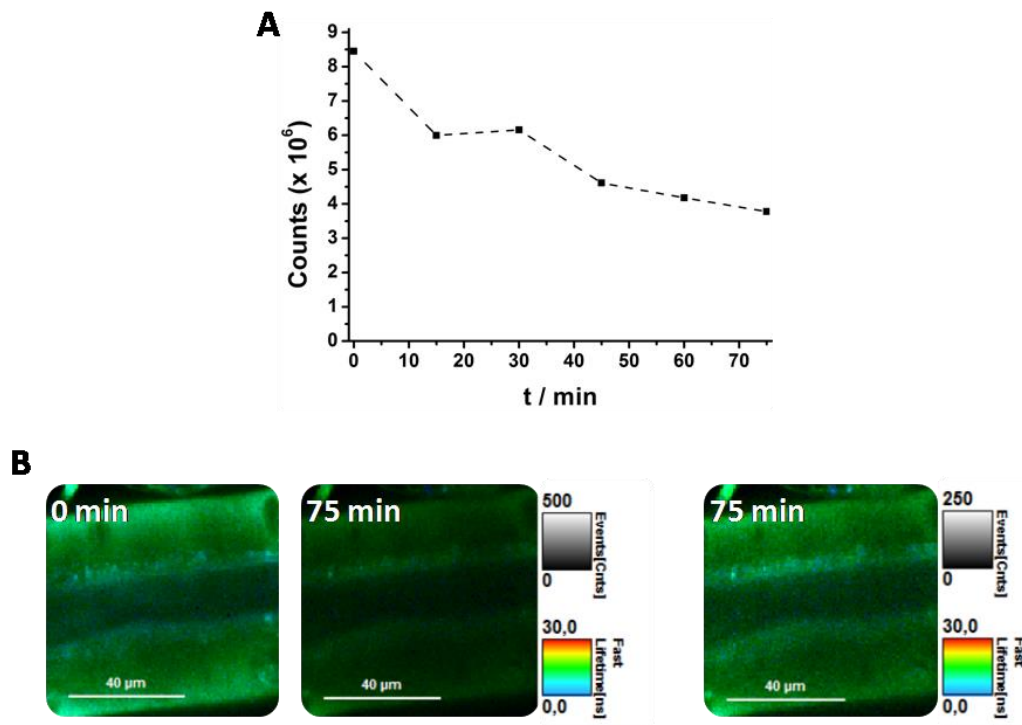


Abbildung 124. Einfluss von Farbstoff-Extrusion auf die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von **129'** in den Ausführgängen. Die Speicheldrüsen wurden für 30 min in einer 2 μM Lösung inkubiert. Es wurde für 75 min alle 15 min ein FLIM-Bild ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$) aufgenommen. A: Dargestellt ist die gemessene Countrate innerhalb von 75 min. B: FLIM-Bilder nach 0 s und 4500 s (75 min), Laserleistung 1000 a.u.

Durch die Stimulation der Ausführgänge der Speicheldrüsen mit biogenen Aminen lassen sich transepitheliale Ionen-Transport-Prozesse untersuchen.^[127] So wird z.B. die Speichelproduktion durch Stimulation mit dem Neurotransmitter Dopamin (DA, Abbildung 125) angeregt, woraufhin es zur reversiblen Ausschüttung von Ca^{2+} kommt. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) steigt dabei, abhängig von der Dopamin-Dosis, langsam, fast tonisch an.^[187] WALZ *et al.* zeigten, dass eine Dopamin-Stimulation (1 μM) in den Ausführgängen zu einer Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $(48 \pm 4) \text{ nM}$ auf $(311 \pm 43) \text{ nM}$ führt. Hierzu führten sie intensitätsbasierte Fluoreszenzmessungen mit dem Ca^{2+} -Sensor Fura-2 durch. Ein erneuter Dopamin-Stimulus führte sogar zu einem vierfach höheren Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.^[185]

Zur Untersuchung der Ca^{2+} -Ausschüttung in den Ausführgängen wurden die mit **129'** beladenen Drüsen zweimal mit einer 1 μM Dopamin-Lösung (in Ringer) für 3-5 min stimuliert. Zwischendurch wurde die Dopamin-Lösung durch reine Ringer-Lösung ersetzt (10-15 min). Währenddessen wurden kontinuierlich FLIM-Bilder aufgezeichnet (Aufnahmezeit: alle 60 s). Abschließend wurde das nicht-ionische Tensid Triton X-100 (1% in Ringer), welches die Zellmembran unspezifisch permeabilisiert, zur Ringerlösung hinzugesetzt. Dadurch kommt es zu einem hohen Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle, da das

Ca^{2+} ($\sim 2 \text{ mM}$) aus dem extrazellulären Raum in die Zelle diffundiert. Der letzte Schritt dient als Kontrollelexperiment, da man aufgrund der hohen Ca^{2+} -Konzentration spätestens hier eine Änderung in der Fluoreszenzabklingzeit messen sollte. Des Weiteren kommt es zu einer starken Ausdehnung des Zellgewebes (vgl. Abbildung 126).



Abbildung 125. Dopamin (DA) und Triton X-100.

In Abbildung 126 sind die FLIM-Bilder eines mit **129'**-beladenen Ausführgangs dargestellt. Durch Zugabe von Dopamin schwellen die Drüsen leicht an. Nach Auswaschung der Dopamin-Lösung verringert sich die Zellausdehnung wieder, was ebenfalls als eine Art Kontrollelexperiment gewertet werden kann. Durch den Dopamin-Stimulus gelangt der Farbstoff in das Lumen, was eher untypisch für gängige Sensorfluorophore ist.^[31,33] Aus diesem Grund verschwimmen die Konturen der Zellkompartimente leicht und der Übergang zum Lumen wird schwer erkennbar. Auch nachdem die Zellen ausreichend mit Ringerlösung gespült wurden, hebt sich der Effekt nicht auf. Nach Zugabe von Triton X-100 ist die zu erwartende Ausdehnung der Zellen deutlich zu erkennen.

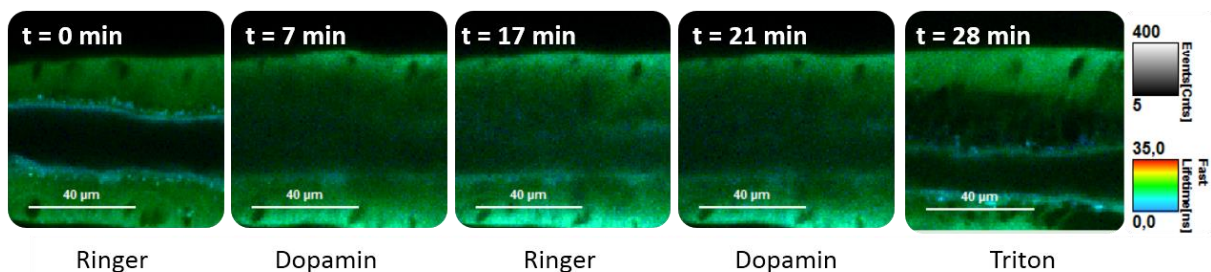


Abbildung 126. FLIM-Bilder eines mit **129'**-beladenen Ausführgangs. Die Speicheldrüsen wurden für 15 min in einer $2 \mu\text{M}$ Lösung inkubiert von **129'** in DMSO. Es wurde für 28 min alle 60 s ein FLIM-Bild ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 430 \text{ nm}$, Laserleistung 1000 a.u.) aufgenommen.

Es wurden mehrere dieser Messungen, mit gleichen Parametern durchgeführt. Über die biexponentielle Dekonvolutions-Analyse der Fluoreszenzabklingkurven aller FLIM-Bilder mittels der Software SYMPHOTIME64 (PICOQUANT, Berlin) ergaben sich die normierten Amplituden α_i und die amplitudengewichteten mittleren Fluoreszenzabklingzeiten $\tau_{\text{avg,amp}}$. Die biexponentiellen Fluoreszenzabklingzeiten wurden auf die mittleren Fluoreszenzabklingzeiten der ersten 3 FLIM-Messungen in Ringer festgesetzt. Nach Auftragung der normierten Amplituden α_i bzw. der $\tau_{\text{avg,amp}}$ nach der Zeit konnte ein Dopamin-abhängiger Verlauf ermittelt werden:

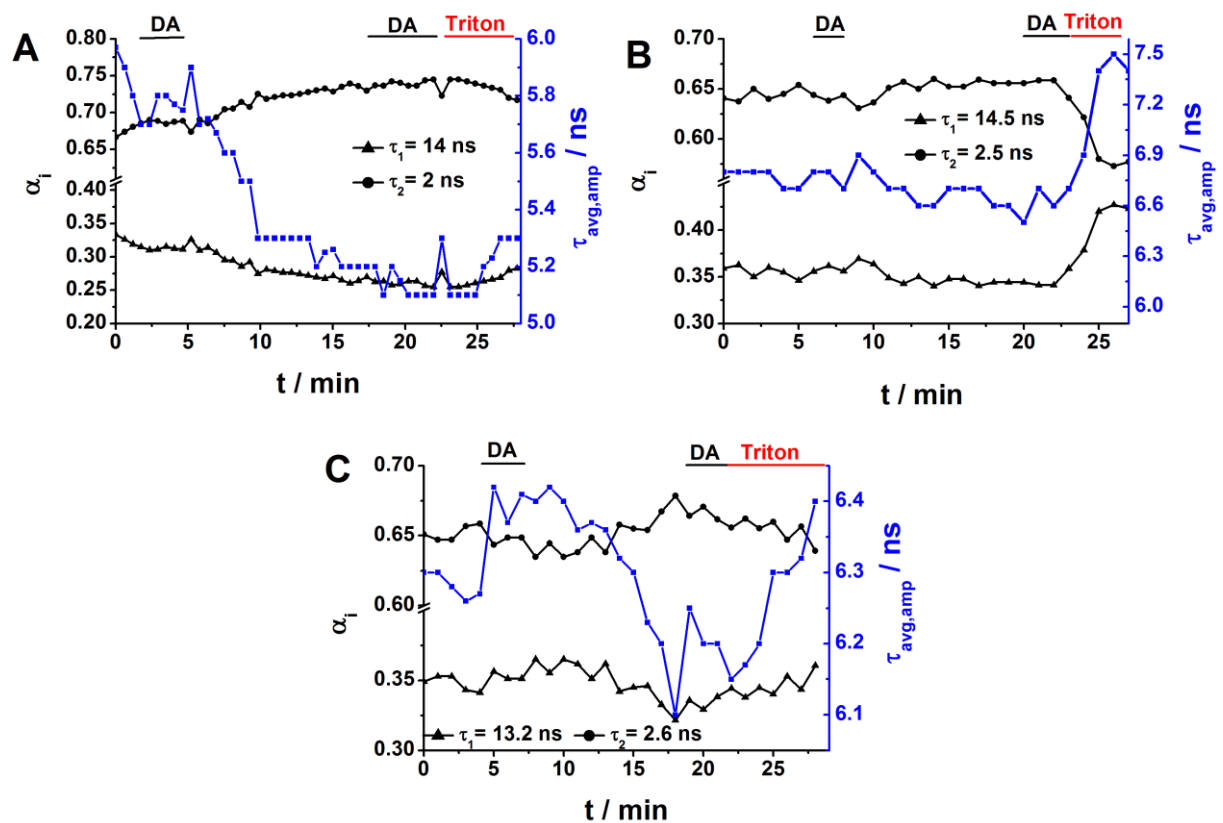


Abbildung 127. Untersuchung Dopamin-induzierter Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in den Ausführgängen mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs **129'** mittels FLIM. Dargestellt sind die normierten Amplituden α_i (schwarz) und die amplituden-gewichteten mittleren Fluoreszenzabklingzeiten $\tau_{avg,amp}$ (blau) in Abhängigkeit von der Messzeit t . Die Kreise entsprechen der normierten Amplitude der Ca^{2+} -freien Spezies von **129'** und die Dreiecke den normierten Amplituden der Ca^{2+} -gebundenen Spezies. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Applikation einer 1 μ M Dopamin-Lösung (DA) und der rote Balken der von Triton X-100.

129' wurde insgesamt 10 Mal vermessen. Hier dargestellt sind 3 der 10 vermessenen Präparate. Aus den drei Graphen in Abbildung 127 ist nicht immer direkt der gewünschte Effekt nach DA-Zugabe zu erkennen. Würde **129'** gut auf eine veränderte $[Ca^{2+}]_i$ reagieren, so würde $\tau_{avg,amp}$ bei DA-Stimulus reversibel ansteigen und nach Auswaschen von DA wieder abfallen. Den gleichen Effekt müsste man in den normierten Amplituden α_i erkennen. Im Graph A ist anfangs ein leichter Anstieg der $\tau_{avg,amp}$ zu erkennen, dieser Effekt tritt bei der zweiten DA-Zugabe jedoch nur noch sehr gering auf. In den Amplituden α_i ist hingegen gar kein Effekt erkennbar. Im Graph B sind auch keine definierten Anstiege in der $\tau_{avg,amp}$ zu erkennen. Im letzten Graph C findet hingegen ein stärker ausgeprägter Anstieg der $\tau_{avg,amp}$ statt, der kaum in den normierten Amplituden α_i zu erkennen ist. In allen Graphen A-C ist ein deutlicher Anstieg der $\tau_{avg,amp}$ nach Triton-Zugabe zu erkennen, was zeigt, dass der Fluoreszenzfarbstoff **129'** in allen Fällen auf die Ca^{2+} -Ausschüttung reagiert. Der gewünschte Ca^{2+} -abhängige Effekt ist für **129'** insgesamt jedoch nicht vorhanden. Mit diesem ersten Modellsystem kann, durch Optimie-

rung der Sensorstruktur, die Entwicklung eines geeigneten empfindlichen Ca^{2+} -Sensors weiter verfolgt werden. Hier sollte auf eine Verkürzung des Linkers zwischen BAPTA und DBD-Fluorophor eingegangen werden. Ein Grund für die geringe Ca^{2+} -Sensitivität könnte der große Abstand zwischen beiden Moleküle sein, der für einen PET wahrscheinlich ungeeignet ist.

Zur Untersuchung der Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs **129'** im Lumen wurden die FLIM-Bilder eines Präparates nur in einem definierten Bereich im Lumen ausgewertet. Dafür wurde in das FLIM-Bild eine ROI (*region of interest*) definiert. Das Fluoreszenzabklingverhalten im Lumen über die Messzeit t nach zwei DA-Zyklen zeigte jedoch keine signifikante Erhöhung der gemessenen Photonencounts bzw. der Fluoreszenzabklingzeit. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine längere Inkubationszeit (30 min) des Fluoreszenzfarbstoffs **129'** zu veränderten Messwerten führt, da immer noch im Raum steht, ob **129'** in der Zelle auch am DBD-Gerüst durch Esterasen verseift wird oder nicht. Es konnten keine Veränderungen der Messwerte nach den DA (2x) und Triton (1x) -Zyklen festgestellt werden. Was entweder darauf hinweist, dass das DBD-Gerüst nicht verseift wird oder bereits nach den ersten 15 min das Carboxylat vorliegt. Um dies zu überprüfen, könnte der DBD-Ester z.B. mit Schweineleberesterase versetzt werden und die Hydrolyse, falls vorhanden, nach der Zeit bestimmt werden. Die Untersuchung wurde jedoch nicht durchgeführt. Die spektroskopischen Eigenschaften von **129'** und dessen K_D -Wert werden vom umgebenden Medium stark beeinflusst. Daher müssen diese Parameter für die jeweiligen Bedingungen bestimmt werden. Durch *in situ* Ca^{2+} -Kalibrierung kann die K_D in den entsprechenden Zellen ermittelt werden. Da **129'** insgesamt noch keine zufriedenstellenden Messergebnisse hervorbrachte, wurde hier jedoch auf eine *in situ* Ca^{2+} -Kalibrierung von **129'** in den Ausführgängen verzichtet.

FLIM-Untersuchungen mit **128'**

Vom Fluoreszenzfarbstoff **128'** konnte *in vitro* zwar kein K_D -Wert ermittelt werden, jedoch wurden auch von ihm 3 FLIM-Messungen aufgenommen:

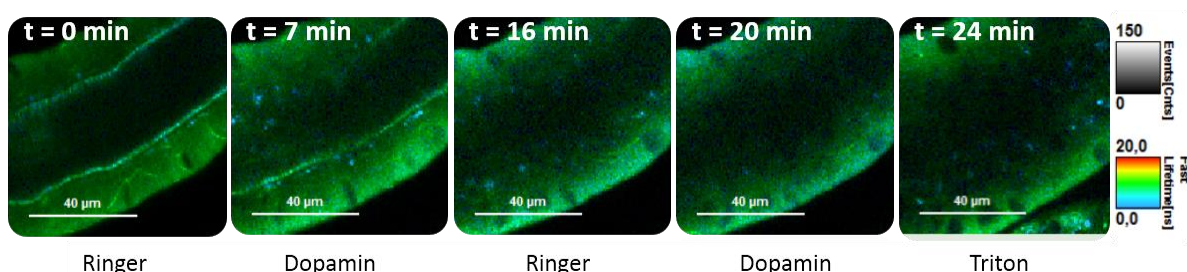


Abbildung 128. FLIM-Bilder eines mit **128'**-beladenen Ausführgangs. Die Speicheldrüsen wurden für 15 min in einer 2 μM Lösung inkubiert. Es wurde für 27 min alle 60 s ein FLIM-Bild ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 430 \text{ nm}$, Laserleistung 2200 a.u.) aufgenommen.

128' färbt die Zellen gleichmäßig an und akkumuliert nicht. Zellkern und Lumen werden zu Beginn nicht angefärbt. Bezüglich des Lumens sieht man einen ähnlichen Effekt nach DA-Stimulus wie bei **129'**. Der Fluoreszenzfarbstoff **128'** wandert ins Lumen, wodurch die Konturen leicht verwischen. Der Effekt scheint sich nach Auswaschen des DA's mit Ringerlösung noch zu verstärken. Hier kann es jedoch auch sein, dass sich die Zellen leicht aus der Fokusebene bewegten. In Abbildung 129 sind die normierten Amplituden α_i und die amplituden-gewichteten mittleren Fluoreszenzabklingzeiten $\tau_{\text{avg,amp}}$ der FLIM-Messung dargestellt.

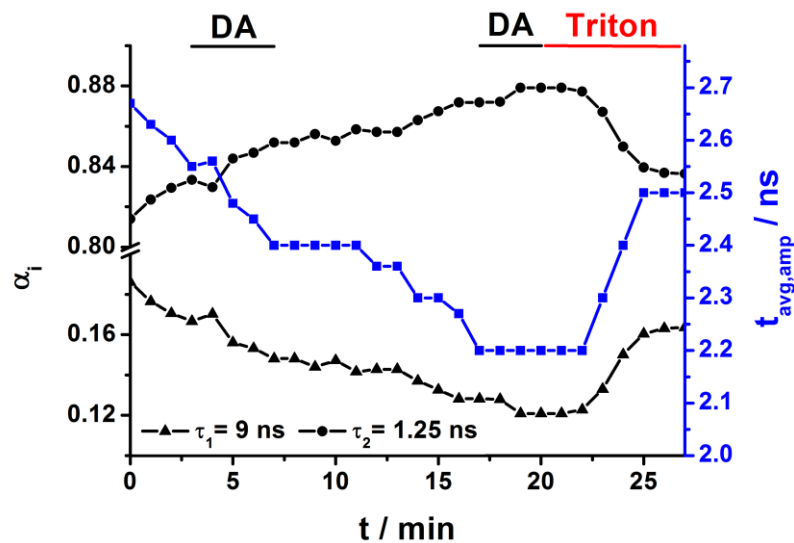


Abbildung 129. Untersuchung Dopamin-induzierter Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den Ausführgängen mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs **128'** mittels FLIM. Dargestellt sind die normierten Amplituden α_i (schwarz) und die amplituden-gewichteten mittleren Fluoreszenzabklingzeiten $\tau_{\text{avg,amp}}$ (blau) in Abhängigkeit von der Messzeit t . Die Kreise entsprechen der normierten Amplitude der Ca^{2+} -freien Spezies von **128'** und die Dreiecke den normierten Amplituden der Ca^{2+} -gebundenen Spezies. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Applikation einer $1 \mu\text{M}$ Dopamin-Lösung (DA) und der rote Balken der von Triton X-100.

Eine Änderung der α_i ist nach DA-Stimulus nicht erkennbar. Stattdessen steigen bzw. fallen die Amplituden kontinuierlich an bzw. ab. Auch die $\tau_{\text{avg,amp}}$ fällt mit der Zeit stetig ab. Nach Triton-Stimulus ist jedoch der erwartete Anstieg/ Abfall der Amplituden und $\tau_{\text{avg,amp}}$ zu erkennen. Der Acyl-DBD-BAPTA-Fluorophor **128'** ist demnach nicht für Ca^{2+} -sensitive Messungen geeignet.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Modellsysteme in Form von Sensor-OS(T)K-Stäben darzustellen, mit denen kraftbasierte FRET-Untersuchungen möglich sind. Hierzu wurden die Fluorophore Coumarin und DBD zum einen zur flexiblen Anbindung und zum anderen zur starren Anbindung an OS(T)K-Stäbe synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert (Abbildung 130). Die Strukturen wurden dabei so gewählt, dass eine direkte Vergleichbarkeit möglich ist und die „Verbinder“ zum OS(T)K-Stab identisch sind. Dabei gelang es erstmals den DBD-Fluorophor so zu funktionalisieren, dass dieser starr an einen OS(T)K-Stab angebracht werden kann.

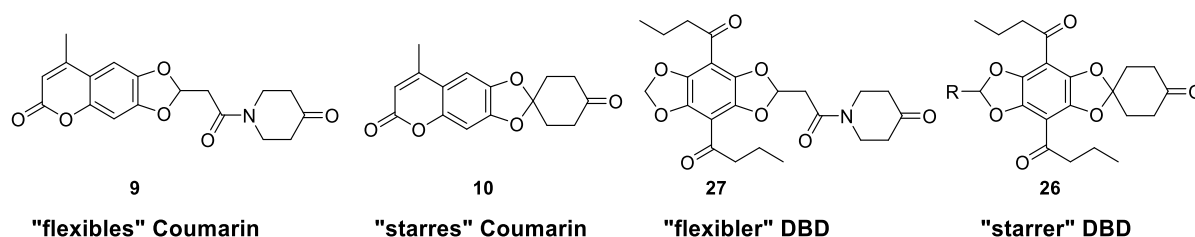


Abbildung 130. Coumarine **9** und **10** sowie DBD **27** und **26**.

Die Synthese und spektroskopische Untersuchung des ersten FRET-Paares **64** bestätigte die hervorragende Eignung der FRET-Partner Coumarin-DBD. Für **64** konnte eine sehr hohe FRET-Effizienz ($E_{\text{FRET}} > 90\%$) detektiert werden, wobei das Überlappungsintegral der Spektren sehr groß ist. Verbindung **64** stellt des Weiteren eine wichtige Referenzverbindung zur Untersuchung von FRET-Sensoren dar. Die Verknüpfung zwischen D und A ist im Gegensatz zu OSTK-Stäben sehr flexibel und es wird ein $\kappa^2 = 2/3$ angenommen. Dadurch lassen sich die einzelnen spektroskopischen Daten gut miteinander vergleichen. Auch hier wäre der Einbau in ein biomimetisches Membranmodell interessant.

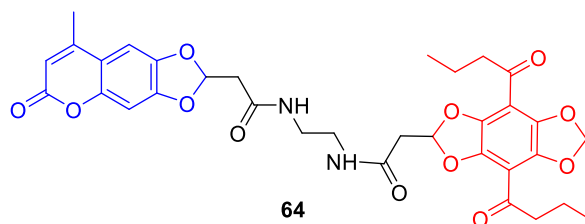


Abbildung 131. FRET-Paar **64**.

Bei der Synthese von mono-funktionalisierten Cou-OSK-Stäben zeigte sich, dass die Synthese nicht trivial ist und stattdessen die symmetrischen zweifach-markierten Cou-OSK-Stäbe **67** und **69** entstanden. Durch die Einführung von Thioketale konnte dieser Umstand umgangen werden und die einfach-markierten-OSTK-Stäbe Cou-OSTK **78**, Cou-f-OSTK **77** sowie DBD-OSTK **80**, DBD-f-OSTK **79** wurden zugänglich (Abbildung 132).

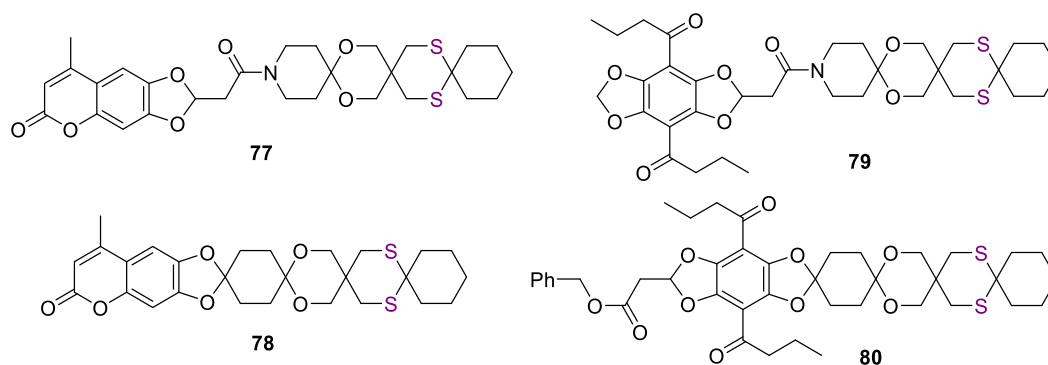


Abbildung 132. Einfach-markierte-OSTK-Stäbe Cou-OSTK **78**, Cou-f-OSTK **77**, DBD-OSTK **80**, DBD-f-OSTK **79**.

Die spektroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die Anbindung der Coumarine an den OSTK-Stab keine signifikante Veränderung in den Absorptions- und Emissionsspektren relativ zu **9** bzw. **10** bewirkte. Im Gegensatz dazu änderten sich die photophysikalischen Eigenschaften von DBD nach Kopplung an den OSTK-Stab in PBS und LUV. Die Emissionsmaxima wurden deutlich hypsochrom verschoben. Der STOKES-Shift sank dabei in PBS von 164 nm für den freien DBD-Fluorophor **26** auf 114 nm nach starrer Anbindung an den OSTK-Stab (**80**). Dies hat gleichzeitig einen positiven Effekt auf das spektrale Überlappungsintegral der Fluorophore. Des Weiteren wurde die Fluoreszenz-abklingkinetik durch die Kopplung verändert, je nach Kopplungsart (flexibel bzw. starr) wurde sowohl die Ordnung der Kinetik wie auch die Abklingzeit modifiziert. Der erfolgreiche Einbau der Sensor-Stäbe in die Lipiddoppelschicht der Vesikel konnte durch die spektrale Verschiebung der Emissionsmaxima und der Änderung von Fluoreszenzlebensdauer bzw. -quantenausbeute, die aufgrund von Polaritätsveränderungen hervorgerufen werden, bestätigt werden. Denn sowohl Cou als auch DBD zeigen eine ausreichende Sensitivität gegenüber der Lösungsmittelpolarität, um den Übergang von polar nach unpolar zu detektieren. Weiterhin konnte der Einbau in die Vesikel durch stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenz-Depolarisationsmessungen bestätigt werden. Durch den Einbau in die Vesikel wurde, aufgrund der eingeschränkten Rotationsbeweglichkeit, eine erhöhte Anisotropie (bzw. Rotationskorrelationszeit) gemessen. Es stellte sich heraus, dass Coumarin sich eher an der Lipid-Wasser-Grenzschicht anlagert und sich der DBD-Fluorophor teilweise in die Lipidmembran einlagert.

Um einen FRET-OSTK-Stab darzustellen, wurden die doppel-markierten OSTK-Stäbe **84** und **85** synthetisiert, die unterschiedliche Anbindungen (flexibel bzw. starr) der Fluorophore Cou und DBD enthalten (Abbildung 133). So wurden unterschiedliche Orientierungen der Übergangsdipolmomente von Cou und DBD zueinander erreicht. Für **85** wird die relative Beweglichkeit der Fluorophore durch die starre Anbindung stark limitiert, wodurch sich ein Orientierungsfaktor (κ^2) nahe vier ergibt. Dahingegen mittelt sich der Orientierungsfaktor für **84**, aufgrund der Beweglichkeit von DBD, auf 2/3.

Die stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzexperimente zeigten, dass sich die photophysikalischen Eigenschaften beider Stäbe voneinander unterscheiden. Ihre spektralen Veränderungen, nach Anbindung an den OSTK-Stab, ähneln der der einfach-markierten-OSTK-Stäbe.

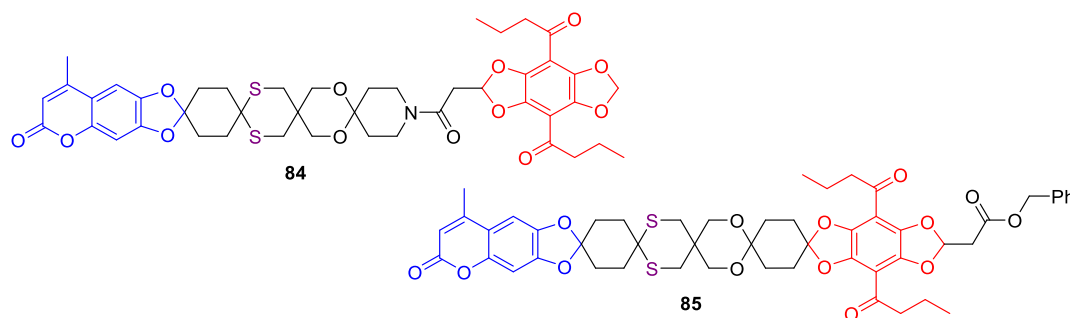


Abbildung 133. Doppel-markierte OSTK-Stäbe **84** und **85**.

Für Cou-OSTK-f-DBD **84** wurden in Aceton und CHCl_3 , entgegen der Theorie, sehr kleine FRET-Effizienzen von $E_{\text{FRET}} \sim 0.3$ gefunden, die auf die starke Beweglichkeit des DBD-Fluorophors und der daraus resultierenden Reduktion des mittleren κ^2 zurückzuführen sind. Für den entsprechenden starren OSTK-Stab **85** wurden hingegen FRET-Effizienzen nahe der theoretischen Werte erhalten ($E \sim 0.9$), was auf die außergewöhnliche Rigidität der OSTK-Stäbe zurückzuführen ist. Hier sind nur minimale Auslenkungen durch Schwingungen möglich. Verglichen mit dem „orthogonalen“ FRET-Paar aus Abbildung 22, wurde hier kein direkter Einfluss von Lösungsumgebung oder Molekülschwingungen auf die experimentelle FRET-Effizienz beobachtet. Die Minimierung von Schwingungseinflüssen auf die FRET-Effizienz ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für kraftbasierte Messungen im pN-Bereich, die auf eine Änderung der Fluoreszenzparameter von D und A basieren. Der Einbau in die Vesikelmembran konnte auch hier durch stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen bzw. Fluoreszenz-Depolarisationsmessungen bestätigt werden.

Die Synthese eines FRET-Gelenkstabes mit OSTK- als auch OSK-Stäben konnte ebenfalls realisiert werden (Abbildung 134). Auf dem ersten Blick unterschieden sich die photophysikalischen Eigenschaften nicht wesentlich von den FRET-OSTK-Stäben **84** und **85**.

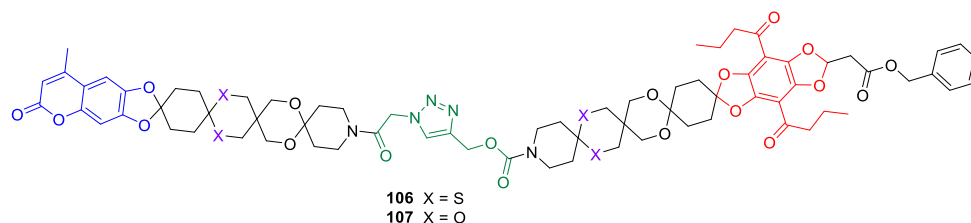


Abbildung 134. FRET-Gelenkstäbe **106** und **107**.

In den Emissionsspektren fielen teilweise vergrößerte Coumarinemissionsbanden auf (im Vergleich zur $\lambda_{\text{em,D}}$), was auf geringe FRET-Effizienzen (vor allem in polaren Lösungsmitteln) hinweist. Für Aus-

sagen über den Einbau in die Vesikelmembran müssen an dieser Stelle noch Anisotropiemessungen folgen.

Bei der Verlängerung der OSTK-Stäbe traten einige Schwierigkeiten auf, da die Synthesen an Thioacetalen und Thioketalen nicht trivial sind. Des Weiteren ist die Verwendung von geeigneten Schutzgruppen, die einerseits selektiv Thiole oder Alkohole schützen und andererseits bei der Abspaltung das Stabgerüst nicht beeinflussen, von entscheidender Bedeutung. Als geeignet stellte sich die Thioacetat-Schutzgruppe heraus, die basisch abgespalten wird und das Stabgerüst nicht beeinträchtigt. Hier wäre es von besonderem Interesse verlängerte Cou-OSTK-DBD-Stäbe analog zu **85** und **84** darzustellen und einerseits die Löslichkeit, andererseits die photophysikalischen Eigenschaften und FRET-Parameter in verschiedenen Lösungsmitteln und Vesikeln genauer zu untersuchen. Die Einführung einer „starren“, löslichkeitsvermittelnden Muffe wäre unter anderem eine attraktive Lösung zur Verlängerung der OSTK-Stäbe.

Insgesamt stellen die synthetisierten Sensor-OS(T)K-Stäbe gute Modellsysteme dar, um das FRET-Signal durch erste photophysikalische Untersuchungen in einem biomimetischen Medium zu charakterisieren. Um Sensor-OS(T)K-Stäbe tatsächlich für kraftbasierte FRET-Untersuchungen nutzen zu können, müssen jedoch noch zahlreiche spektroskopische Untersuchungen und synthetische Optimierungen vorgenommen werden. Zur besseren Einschätzung des Einflusses von Molekülschwingungen auf die FRET-Effizienzen der doppelt-markierten Stäbe könnten Ultra-Tieftemperaturexperimente durchgeführt werden, in denen die Temperaturabhängigkeiten der FRET-Parameter aufgelöst werden. Einzelmolekül-FRET-Experimente könnten ebenfalls Aufschluss darüber geben. Von Interesse wäre auch der Einbau in GUV's (*giant unilamellar vesicles*) und die photophysikalische Untersuchung der Inkorporation in die Membran (verglichen zu den Vesikeln), sowie der Verbildlichung mittels konfokaler Lasermikroskopie. Durch den Einsatz von Fluoreszenzlöschern kann die Einlagerung der Fluorophore Coumarin und DBD an die Grenzschicht Wasser/Lipidmembran bzw. in die Lipidmembran noch detaillierter bestimmt werden. Geeignete Fluoreszenzlöschler sind zum einen das wasserlösliche Iod und zum anderen das lipidlösliche Dicyanobenzol, wodurch die Fluoreszenz sowohl an der Grenzschicht als auch in der Lipidmembran manipuliert werden kann.

Weitere interessante Weiterentwicklungen wären z.B. ein starres FRET-System, dessen Fluorophore zueinander orthogonale Übergangsdipolmomente aufweisen und nach Abbildung 21 erst nach Krafteinfluss, in Form von Verbiegung, einen FRET erzeugen. Die Fluorophore Rhodamin (**4**) und BODIPY (**5**) aus Abbildung 34 könnten u. a. als orthogonale FRET-Akzeptoren, bzgl. DBD als Donor, eingesetzt werden. Davon ausgehend könnte ein Dreifarben-FRET-System (Cou-DBD-Fluorophor) dargestellt werden, dessen Fluoreszenz dynamisch geschaltet werden kann. Zur Bestimmung von Kräften auf

molekularen Skalen hat sich u. a. die Verknüpfung von Rasterkraftmikroskopie mit optischen Verfahren etabliert, die ebenfalls zur näheren Untersuchung der Sensor-OSTK-Stäbe dienen könnte.

Durch Einführung von Brom an den Coumarin-Chromophor konnte ein neuartiges 2P-FRET-Paar **127** dargestellt werden. Der 2P-Absorptionsquerschnitt konnte für das Coumarin **123**, in DMSO und einer Anregung bei 780 nm, um 74% gesteigert werden bzgl. des nicht-bromierten Coumarins **12** (0.01 → 0.74). Durch Optimierung der Anregungswellenlänge auf 720 nm wurden die erhaltenen 2P-Absorptionsquerschnitte sogar auf bis zu 17.22 für **123** in ACN gesteigert. FLIM-Untersuchungen in den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen der Schabe *P. AMERICANA* zeigten, dass das 2P-FRET-Paar **127** gut in die Zellen geht, sich gleichmäßig verteilt und nicht agglomeriert. Die mittlere Fluoreszenzabklingzeit von 5.5 ns ist ideal für FLIM-Untersuchungen, da der Autofluoreszenz-Bereich der Zellkompartimente fast vollständig ausgeblendet wird. Um **127** oder die einzelnen Fluorophore **24** und **123** für weitere Anwendungen zu nutzen, müssten DBD oder Coumarin speziell funktionalisiert werden, um z.B. ein Bindungsereignis in den Zellen zu registrieren oder ebenfalls abstandsabhängige FRET-Untersuchungen durchzuführen.

Ein weiteres Ziel war es, einen Ca^{2+} -Sensor aufbauend auf DBD und BAPTA zu synthetisieren. Es stellte sich heraus, dass der Acyl-DBD kombiniert mit BAPTA (**128**) zur interzellulären Detektion von Ca^{2+} nicht geeignet ist. Aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute in H_2O ($\phi_F \sim 0.1$) konnte die *in vitro* K_D nicht bestimmt werden. Auch die FLIM-Untersuchungen zeigten nach Dopamin-Stimulus nicht den gewünschten Effekt in den normierten Amplituden α_i bzw. der amplitudengewichteten mittleren Fluoreszenzabklingzeit $\tau_{\text{avg,amp}}$. Der Ester-DBD-Fluorophor erzielte dahingegen bessere Messergebnisse. Hier besteht jedoch das Problem, dass die *in vitro*-Kalibrierung der Ca^{2+} -Konzentration eine vorherige Hydrolyse der Ester-Gruppen am BAPTA-Gerüst voraussetzt, wobei der Ester-DBD selbst hydrolysiert werden kann. Um dieses Problem zu umgehen, sollte der Benzylgeschützte BAPTA-Fluorophor **130** verwendet werden. Die Abspaltung der Schutzgruppe durch Hydrierung führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt. Die Hydrierung von **130** müsste weiterhin optimiert werden. Es ist außerdem noch nicht geklärt, ob während der FLIM-Untersuchungen die Ester-Gruppen des DBD-Gerüsts von **129** erhalten bleiben oder durch Esterasen gespalten werden. Hier müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Eine einfache Methode wäre zunächst der Versuch, die Estergruppen durch Schweineleberesterase zu spalten. Der für **129'** *in vitro* bestimmte K_D -Wert von 130 nM liegt im physiologisch interessanten Messbereich für intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen. Trotzdem wurden nach Dopamin-Stimulus in den FLIM-Untersuchungen nur geringe Auslenkungen in den α_i und der $\tau_{\text{avg,amp}}$ detektiert. Eine *in situ* Ca^{2+} -Kalibrierung machte auf dieser Grundlage noch keinen Sinn. Um dennoch einen geeigneten Ca^{2+} -sensitiven DBD-Fluorophor darzustellen, bieten sich einige Möglichkeiten. Zum einen könnte die Anbindungslänge zwischen DBD

und BAPTA reduziert werden. Noch besser wäre es, ein konjugiertes Fluorophor-System ähnlich zu **150** zu synthetisieren. An einer asymmetrischen Funktionalisierung des DBD-Gerüsts in 4- und 8-Position wird im Arbeitskreis WESSIG stets geforscht.^[151] M. MERTENS gelang es kürzlich solch einen asymmetrisch-funktionalisierten-DBD **151** mit einer Ausbeute von 18%, durch einen zweistufigen Lithierungsschritt über ein Weinrebamid, herzustellen.^[188] Die Einführung neuer funktioneller Gruppen in 4- und 8-Position (z.B. Amide) ist ebenfalls eine Möglichkeit.

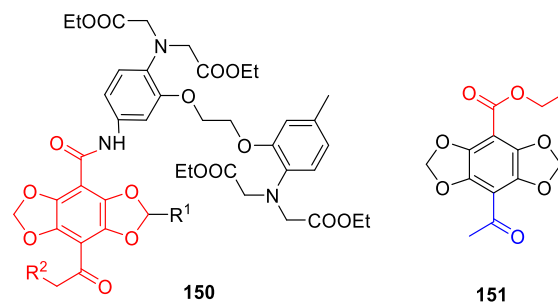


Abbildung 135. Verbindungen **150** und **151**.

Darüber hinaus kann DBD auch zur Detektion anderer Analyte wie K^+ oder Na^{2+} , durch Einführung eines Kronenethers, und vieler weiterer, durch entsprechende Funktionalisierung, eingesetzt werden.

6 Experimentaltteil

6.1 Allgemeines

6.1.1 Arbeitsweise, verwendete Lösungsmittel und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen ABCR, ALDRICH, FLUKA, LANCASTER, MERCK, TCI und J.T. BAKER bezogen. Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet. Synthesen, die luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Substanzen enthielten, wurden unter Schutzgas (N_2) in ausgeheizten Glasapparaturen mit getrockneten Lösungsmitteln durchgeführt. Die Trocknung der Lösungsmittel erfolgte nach Standardmethoden.^[189] Zur Trocknung von organischen Verbindungen wurde $MgSO_4$ verwendet. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum am Rotationsverdampfer, bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C entfernt. Verbleibende Lösungsmittelreste wurden im Hochvakuum bei $1 \cdot 10^{-3}$ mbar entfernt. Die Analyse und Charakterisierung der organischen Verbindungen erfolgte mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie (DC), NMR, IR, UV/Vis, MS, MALDI-TOF-MS und Schmelzpunktbestimmung. Zur Reinigung der Substanzen wurden Flashchromatographie und HPLC verwendet.

6.1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC):

Die Reaktionsverfolgung erfolgt mittels DC. Dafür wurden Kieselgel-Aluminiumfolien mit Fluoreszenz-Indikator (60 F254) der Firma MERCK verwendet. Als Laufmittel dienten unterschiedliche Gemische von DCM/MeOH, EE/*n*-Hexan oder EE/PE. Die Substanzen wurden mittels UV-Licht (254 nm), Schwarzlicht detektiert oder durch Anfärben mit einer der folgenden Reagenzien und Erhitzen mit dem Heißluftföhn (200 °C):

- 1.0 g $Ce(SO_4)_2 \cdot 4 H_2O$ und 2.5 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$ in 100 mL 1.8 M H_2SO_4
- 3.0 g $KMnO_4$, 20.0 g K_2CO_3 und 5 mL 5%ige NaOH in 300 mL H_2O

Flash-Säulenchromatographie (FC):

Die meisten Substanzen wurden mittels Säulenchromatographie unter Luft-Überdruck gereinigt. Dafür wurden Normalglassäulen mit Kieselgel 60 (40 – 63 μm) der Firma FLUKA verwendet. Als Laufmittel wurden verschiedene Lösungsmittel oder -gemische, wie DCM, EE, DCM/MeOH, DCM/MeOH/ NEt_3 , DCM/MeOH/Ameisensäure, EE/*n*-Hexan, EE/PE genutzt. Die Lösungsmittel für die Flashchromatographie wurden am Rotationsverdampfer gereinigt.

6.1.3 Physikalische Messgeräte

Einwaagen:

Einwaagen bis 100 mg wurden an einer Feinwaage der Firma SARTORIUS (BP210D) und Einwaagen ab 100 mg an einer Analysenwaage der Firma SARTORIUS (LC3201D) vorgenommen.

Schmelzpunkte (F_p):

Die Schmelzpunkte wurden mit einem ELEKTROTHERMAL 9300 (unkorrigiert) gemessen.

Massenspektrometrie (MS):

Die Massenspektren wurden mit folgenden Geräten aufgenommen:

- EI: HEWLETT-PACKARD GC-MS 5995-A-Spektrometer (70 eV, Temperaturbereich 293 bis 593 K)
- ESI: THERMO FINNEGAN LTQ-FT-Massenspektrometer

Große Moleküle wurden mit Hilfe des MALDI-TOF Massenspektrometers - AXIMA ASSURANCE - der Firma SHIMADZU BIOTECH bestimmt und mit der Software LAUNCHPAD 2.8 ausgewertet. Exakte Molmassen von Substanzen mit TBS-Schutzgruppen waren nicht immer bestimmbar, Substanzen mit Mmt-Gruppen konnten gar nicht mittels MS detektiert werden.

Kernresonanzspektroskopie (NMR):

Alle NMR-Spektren wurden als Flüssig-NMR-Spektren aufgenommen und mit dem BRUKER AVANCE 300 MHz bzw. 500 MHz Spektrometer vermessen. Als Lösungsmittel wurden CDCl_3 und DMSO-d_6 , MeOH-d_4 , C_6D_6 und Aceton- d_6 verwendet. Die Spektren wurden anhand der in Tabelle 23 angegebenen Signale kalibriert. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm und die vicinale (3J) und long-range (4J) Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die Feinstruktur der Signale wurde als s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), dd (Duplett vom Duplett), t (Triplet), dt (Duplett vom Triplet), m (Multiplet) und quint (Quintett) bezeichnet.

Tabelle 23: Chemische Verschiebungen der Lösungsmittel

Lösungsmittel	^1H (δ in ppm)	^{13}C (δ in ppm)
CDCl_3	7.27	77.00
DMSO-d_6	2.50	39.51
Aceton- d_6	2.05	29.92
MeOH-d_4	3.31	49.15
C_6D_6	7.16	128.39

Infrarot-Spektroskopie (IR):

Die IR-Spektren wurden mit einem PERKIN ELMER FTIR-Spektrometer *Spectrum 2* aufgenommen.

UV/VIS-Spektroskopie:

Für UV/Vis Messungen wurde ein JASCO V-630 Zweistrahl-UV/VIS-Spektrometer (190-900 nm) verwendet. Die UV-Küvetten stammen von der Firma HELMA und sind aus Quarzglas Suprasil mit einer Schichtdicke von 10 mm.

Fluoreszenzspektroskopie:

Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluoromax 4 der Firma HORIBA JOBIN YVON aufgenommen. Die Fluoreszenzlebensdauer wurde über TCSPC mittels eines HORIBA JOBIN YVON Single Photon Counting Controller Fluorohub in Verbindung mit dem genannten Spektrometer vermessen. Als Anregungsquelle dienten HORIBA NanoLEDs mit Wellenlängen von 372 nm und 443 nm. Zur Auswertung wurden die Softwareprogramme DataStation (v.2.5) und DAS6 (v.6.4) der Firma Horiba genutzt. Quantenausbeuten wurden mit dem modularen Gerät C9920-02/-03 der Firma HAMAMATSU PHOTONICS (ULBRICHTKugel) vermessen. Als Probengefäße dienten 10 mm Quarzglas-Küvetten. Zur Auswertung wurde die integrierte Software von HAMAMATSU verwendet.

Zwei-Photon-Absorptionsmessungen:

Zwei-Photon-Absorptionsmessungen wurden an einem FLS920 Spektrometer von EDINBURGH INSTRUMENTS LTD., ausgestattet mit einem R928P-Photomultiplier Detektor von HAMAMATSU, durchgeführt. Die gepulste Laser-Anregung erfolgte durch einen, von einem Nd:YVO₄-Laser (Coherent Verdi V18) gepumpten, modengekoppelten Titan:Saphir-Laser (Coherent Mira-HP) mit einer Pulsdauer und Wiederholungsrate von 100 fs bzw. 80 MHz der Firma COHERENT DEUTSCHLAND GMBH. Die Messung erfolgte bei 780 nm und 720 nm. Das Pulsspektrum (FWHM 10 nm) wurde während der Messungen durch das computergesteuerte AVASPEC-Spektrometer der Firma AVANTES BV überwacht. Eine achromatische NIR-Linse (THORLABS GmbH) wurde zur Fokussierung des Laserstrahls verwendet, zusammen mit einem neutralen Dichte (ND)-Filter für eine durchschnittliche Laserleistungseinstellung (200 mW bis 500 mW). Die Laserleistung wurde vor dem Start der Messung überwacht. Die spektrale Auflösung wurde auf 1 nm eingestellt. Unterschiede in der Signalintensität wurden durch Anpassung der Integrationszeiten (0.1 s bis 2.0 s) kompensiert. Die Farbstoffkonzentrationen variierten zwischen $2.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ - $1.8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ abhängig von Lösungsmittel und Farbstoffmolekül. Jede Probe wurde drei Mal vermessen.

Tabelle 6.1. 2P-Daten von Fluoreszein^[163]

λ /nm	σ_{2p} /GM
720	21
780	45

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie:

Fluoreszenzlebenszeitenmikroskopie-Messungen wurden am MicroTime200 der Firma PICOQUANT aufgenommen. Es basiert auf einem inversen Mikroskop (IX71, Olympus) und wurde für zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen und FLIM-Untersuchungen (*fluorescence lifetime imaging microscopy*) genutzt. Die Auswertung erfolgte über die Software SymPhoTime64. Die Angabe der Messdaten erfolgte als Mittelwert (MW) mit dazugehörigem Standardfehler (SE) oder als angepasster Parameter und dessen Fehler aus der Anpassung.

6.1.4 Herleitungen**Herleitung für K_D :**

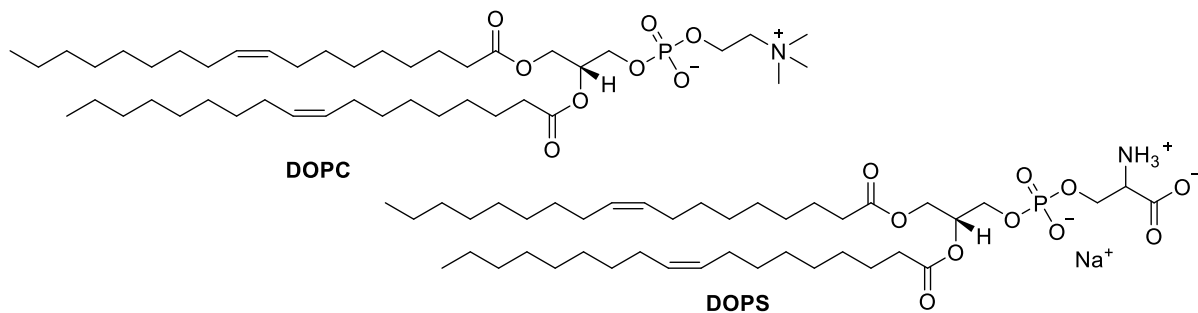
Es gilt das Massenwirkungsgesetz: $\text{CaF} \rightleftharpoons \text{Ca}^{2+} + \text{F}$

$$K_D = \frac{[\text{Ca}^{2+}][\text{F}]}{[\text{CaF}]} \rightarrow [\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot \frac{[\text{CaF}]}{[\text{F}]} \quad (6.1)$$

CaF und F entsprechen jeweils der Ca^{2+} -freien und der Ca^{2+} -gebundenen Fluorophor-Form. K_D ist die Dissoziationskonstante des Fluorophors.

6.1.5 Präparation der Vesikel

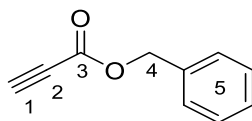
Die Herstellung der Vesikel (LUV, *large unilamellar vesicles*) erfolgte aus den Phospholipiden DOPS (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin) und DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) von URSULA EISOLD (Universität Potsdam, Arbeitskreis für Physikalische Chemie). Sie sind in Abbildung 136 dargestellt.

**Abbildung 136.** Strukturen von DOPC und DOPS

Es wurden Stammlösungen von DOPC und DOPS in CHCl_3 (10 mg/mL) hergestellt. Stammlösungen der Fluorophore und OSTK-Stäbe wurden in MeOH oder Aceton mit einer Konzentration von 10^{-3} M hergestellt. Für die Präparation der Vesikel wurde zunächst ein Lipidfilm aus DOPC und DOPS im Verhältnis 4:1 hergestellt. Dafür wurden 100 μl der DOPS-Stammlösung in eine 400 μl DOPC-Stammlösung pipettiert und mit 500 μl Chloroform verdünnt. Nach Zugabe von 1 μl OSTK- bzw. Fluorophor-Stammlösung wurde die Mischung durch Schütteln vermischt und in einem Stickstoffstrom getrocknet. Zur gründlichen Entfernung von Chloroform wurde der Lipidfilm für 1 h im Hochvakuum verdampft. Der Lipidfilm wurde in 2 mL PBS hydratisiert, sodass die resultierende Gesamtlipidkonzentration 2.5 g/L bzw. 3.15 M betrug. Die Mischung wurde in einem Trockenofen bei 40 °C für 1 h erhitzt. Nach etwa fünf Gefrier- und Auftauzyklen, wurde die Lösung etwa 35-mal durch eine Membran eines Miniextruders (Avanti Polare Lipide), mit einem Durchmesser von 100 nm, gepresst. Die finale Fluorophor- bzw. OSTK-Konzentration betrug $5 \cdot 10^{-7}$ M.

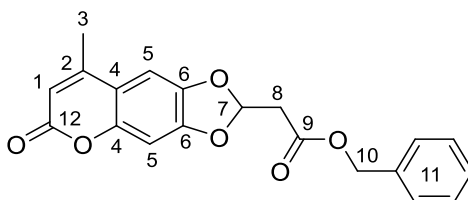
6.2 Synthesevorschriften

Benzylpropiolat (**11**)^[190,191]



Propiolsäure (877.2 μL , 14.28 mmol) und Benzylalkohol (1.6 mL, 15.42 mmol, 1.08 eq.) wurden in DCM (15 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurde eine Lösung aus DMAP (17.4 mg, 14.28 mmol, 0.01 eq.) und DCC (2.9 g, 14.28 mmol, 1.00 eq.) in DCM (15 mL) über 1h getropft. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde über Celite® filtriert und im Vakuum konzentriert. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 30:1) gereinigt. Man erhielt **11** (1.9 g, 11.86 mmol, 83%) als ein farbloses Öl. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

Benzyl-2-(8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)acetat (**12**)



6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin (200 mg, 1.04 mmol) und Benzylpropiolat (**11**, 200 mg, 1.25 mmol, 1.2 eq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von DMAP (203 mg, 1.67 mmol, 1.6 eq.) wurde die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (Hex/EE 3:1) gereinigt. Man erhielt **12** (330 mg, 0.94 mmol, 90%) als einen weißen Feststoff.

DC: Hex/EE 1:1 $R_f = 0.58$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 7.28 - 7.39 (m, 5H, H-11), 6.92 (s, 1H, H-5), 6.78 (s, 1H, H-5), 6.64 (t, $^3J=5.1$ Hz, 1H, H-7), 6.16 (d, $^4J=1.1$ Hz, 1H, H-1), 5.20 (s, 2H, H-10), 3.08 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-8), 2.35 (d, $^4J=1.1$ Hz, 3H, H-3)

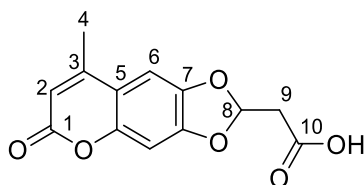
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 167.4 (C-9), 161.0 (C-12), 152.3 (C-2), 150.5 (C-6), 150.4 (C-5), 144.5 (C-6), 135.1 (C-11), 128.6 (C-11), 128.5 (C-11), 128.4 (C-11), 113.9 (C-4), 112.3 (C-1), 109.4 (C-5), 102.2 (C-5), 98.4 (C-7), 67.1 (C-10), 40.0 (C-8), 19.0 (C-3)

F_p: 97 – 98 °C

IR: 3439, 3088, 3059, 3031, 2945, 1724, 1630, 1582, 1375, 1500, 1452, 1419, 1395, 1344, 1309, 1268, 1221, 1193, 1144, 1118, 1048, 1029, 984, 923, 859, 838, 805, 747, 699 cm^{-1}

MS: (ESI) $m/z = 352.0943$ [M]⁺, berechnet: 352.0947

2-(8-Methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)essigsäure (**13**)



12 (440 mg, 1.25 mmol) wurde in trockenem THF (150 mL) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Pd/C (10%) wurde die Suspension unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, wurde die Suspension über Celite® abfiltriert, mit MeOH gewaschen und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 10:1 zu DCM/MeOH/ NEt_3 10:1:0.5) gereinigt und man erhielt **13** (264 mg, 1.01 mmol, 80%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 10:1 $R_f = 0.15$; DCM/MeOH/ NEt_3 10:1:0.5 $R_f = 0.61$

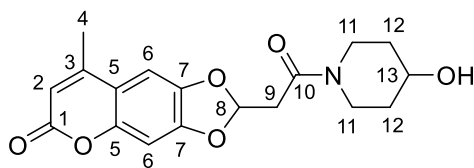
$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.25 (s, 1H, H-6), 7.06 (s, 1H, H-6), 6.66 (t, $^3J=5.1$ Hz, 1-H), 6.22 (s, 1H, H-2), 3.05 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-9), 2.35 (d, $^4J=1.1$ Hz, 3H, H-4)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 170.1 (C-10), 161.0 (C-1), 154.4 (C-3), 151.2 (C-5), 150.8 (C-7), 145.1 (C-7), 114.2 (C-5), 112.1 (C-2), 111.0 (C-6), 103.7 (C-6), 98.6 (C-8), 19.498 (C-4)

F_p: Zersetzung ab 210 °C

IR: 3458, 3057, 2965, 1736, 1676, 1620, 1576, 1496, 1451, 1403, 1373, 1351, 1269, 1245, 1210, 1183, 1157, 1055 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 262.0462$ [M]⁺, berechnet: 262.0472

2-(2-(4-Hydroxypiperidin-1-yl)-2-oxoethyl)-8-methyl-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-6-on (14)

Variante 1: **13** (50 mg, 0.91 mmol) wurde in trockenem DMF (10 mL) gelöst und es wurden 4-Hydroxypiperidin (20 mg, 0.20 mmol, 1.05 eq.), DCC (28 mg, 0.21 mmol, 1.1 eq.) und HOBt (43 mg, 0.21 mmol, 1.1 eq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Der entstandene Harnstoff wurde über Celite® abfiltriert und die Lösung mit 0.1N HCl, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **14** (60 mg, 0.17 mmol, 91%) als einen weißen Feststoff.

Variante 2: **12** (247 mg, 0.70 mmol) wurde in trockenem THF (50 mL) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Pd/C (10%) wurde die Suspension unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, wurden 4-Hydroxypiperidin (71 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.), DCC (159 mg, 0.77 mmol, 1.1 eq.) und HOBt (104 mg, 0.77 mmol, 1.1 eq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Der entstandene Harnstoff wurde über Celite® abfiltriert und die Lösung mit 0.1 N HCl, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **14** (189 mg, 0.55 mmol, 78%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 10:1 $R_f = 0.42$

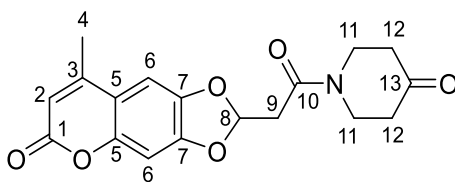
¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.91 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-6), 6.71 (t, ³J=5.09 Hz, 1H, H-8), 6.12 (s, 1H, H-2), 3.90 - 4.09 (m, 2H, H-11), 3.62 - 3.75 (m, 1H, H-13), 3.17 - 3.38 (m, 2H, H-11), 3.04 (d, ³J=5.09 Hz, 2H, H-9), 2.23 (m, 3H, H-4), 1.87 (m, 2H, H-12), 1.56 (m, 2H, H-12)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 165.4 (C-10), 161.2 (C-1), 152.5 (C-3), 150.6 (C-5), 150.4 (C-7), 144.6 (C-7), 113.8 (C-2), 112.0 (C-5), 111.0 (C-6), 102.1 (C-8), 98.2 (C-6), 66.4 (C-13), 42.8 (C-11), 38.8 (C-11), 38.4 (C-9), 34.2 (C-12), 33.5 (C-12), 19.0 (C-4)

F_p: 98-100 °C

IR: 3830, 3422, 3057, 2927, 2861, 2694, 2669, 1582, 1493, 1449, 1402, 1386, 1347, 1264, 1204, 1141, 1116, 1075, 1047, 1029, 1010, 961, 920, 856, 806, 779, 745, 711, 676, 640 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 345.1221 [M]⁺, berechnet: 345.1244

1-(2-(8-Methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)acetyl)piperidin-4-on (9)

14 (628 mg, 1.82 mmol) wurde in trockenem DCM (80 mL) gelöst, DESS-MARTIN-Periodinan (848 mg, 2.00 mmol, 1.1 eq.) wurde hinzugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Es wurde dreimal mit gesättigter $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (250 g/L) und NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **9** (561 mg, 1.63 mmol, 90%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.29$

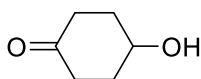
$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 6.92 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-6), 6.74 (t, $^3J=4.99$ Hz, 2H, H-8), 6.11 (s, 1H, H-2), 3.93 (t, $^3J=5.93$ Hz, 2H, H-11), 3.77 (t, $^3J=6.12$ Hz, 2H, H-11), 3.14 (d, $^3J=4.90$ Hz, 2H, H-9), 2.51 (q, $^3J=5.65$ Hz, 4H, H-12), 2.33 (s, 3H, H-4)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 205.8 (C-13), 166.0 (C-10), 161.0 (C-1), 152.2 (C-3), 150.5 (C-5), 150.4 (C-7), 144.5 (C-7), 113.9 (C-5), 112.3 (C-2), 110.7 (C-6), 102.2 (C-6), 98.4 (C-8), 44.1 (C-11), 40.9 (C-11), 40.7 (C-12), 40.5 (C-12), 38.5 (C-9), 19.0 (C-4)

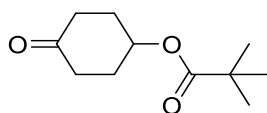
F_p : 174 °C

IR: 3126, 2933, 2858, 1730, 1644, 1583, 1493, 1446, 1402, 1381, 1366, 1346, 1263, 1221, 1201, 1165, 1142, 1092, 1037, 963, 918, 888, 847, 824, 806, 778, 745, 728, 709, 648 cm^{-1}

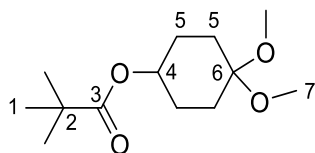
MS: (EI) $m/z = 343.1064$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 343.1056

4-Hydroxycyclohexanon (17)^[52,192]

In einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (700 mL/ 70 mL) wurde 1,4-Dihydroxycyclohexanon (15.0 g, 129.13 mmol) gelöst und auf 80 °C erwärmt. NaBrO_3 -Lösung (130 mL H_2O , 19.5 g NaBrO_3 , 129.23 mmol, 1.0 eq.) und CAN -Lösung (100 mL H_2O , 7.1 g CAN , 12.95 mmol, 0.1 eq.) wurden unter Rühren zugegeben und es wurde 20 min bei 80 °C gerührt. Die Suspension wurde rasch auf Raumtemperatur abgekühlt und dreimal mit $\text{Et}_2\text{O}/\text{DCM}$ (v/v 5:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (250 g/L) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt und man erhielt **17** als ein blaugelbes Öl (9.2 g, 80.60 mmol, 62%). Das Gemisch wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

2,2-Dimethylpropansäure-4-oxocyclohexylester (18)^[52]

17 (9.2 g, 80.60 mmol) wurde in trockenem DCM (100 mL) und trockenem Pyridin (14.9 mL, 185.4 mmol, 2.3 eq.) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Pivalinsäurechlorid (14.9 mL, 120.9 mmol, 1.5 eq.) und DMAP (Spatelspitze) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit 0.1N HCl und dreimal mit NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (Hexan/EE 7:1 -> 5:1) gereinigt. Man erhielt **18** (14.0 g, 70.6 mmol, 88%) als einen weißen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

4,4-Dimethoxycyclohexylpivalat (21)

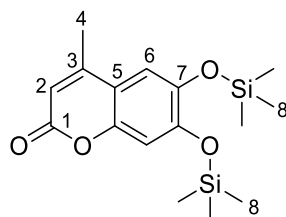
18 (1.0 g, 5.04 mmol) und pTsOH·H₂O (9.5 mg, 0.05 mmol, 0.01 eq.) wurden in Trimethoxymethan/MeOH 5:1 (18 mL) bis zum vollständigen Umsatz (45 min), überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, gerührt. NEt₃ (0.5 mL) wurde zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE -> PE/EE 20:1) gereinigt. Man erhielt **21** (1.23 g, 5.04 mmol, quant.) als ein farbloses Öl.

DC: PE/EE 5:1 R_f = 0.62

¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, C₆D₆): 4.90 (s, 1H, H-4), 2.99 (s, 2H, H-7), 2.95 (s, 2H, H-7), 1.74 (m, 2H, H-5), 1.69 - 1.59 (m, 4H, H-5), 1.56 - 1.46 (m, 2H, H-5), 1.17 - 1.12 (m, 9H, H-1)

¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, C₆D₆): 177.4 (C-3), 99.7 (C-6), 70.6 (C-4), 47.8 (C-5), 47.5 (C-5), 29.5 (C-7), 27.9 (C-7), 27.7 (C-1)

IR: 2957, 2874, 2829, 1725, 1481, 1461, 1449, 1436, 1397, 1377, 1364, 1335, 1283, 1251, 1237, 1164, 1141, 1097, 1080, 1054, 1032, 984, 964, 935, 918, 903, 771 cm⁻¹

4-Methyl-6,7-bis(trimethylsilyloxy)-2H-chromen-2-on (20)

6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin (3.00 g, 15.61 mmol) wurde in trockenem Toluol (100 mL) suspendiert und es wurden vorsichtig getrocknetes NEt_3 (9.48 mg, 93.67 mmol, 6.0 eq.) und TMSCl (10.18 g, 93.67 mmol, 6.0 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite® abfiltriert, mit PE gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in PE suspendiert und nochmals über Celite® abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **20** (15.20 g, 15.45 mmol, 99%) als einen weißen Feststoff.

DC: Hex/EE 3:1 $R_f = 0.6$

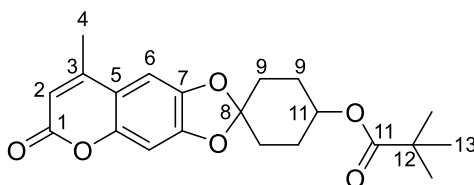
$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 6.99 (s, 1H, H-6), 6.82 (s, 1H, H-6), 6.15 (s, 1H, H-2), 2.35 (s, 3H, H-4), 0.31 (s, 9H, H-8), 0.27 (s, 9H, H-8)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 161.4 (C-1), 152.0 (C-3), 150.5 (C-5), 149.2 (C-7), 143.7 (C-7), 115.1 (C-6), 114.0 (C-5), 112.5 (C-6), 108.5 (C-2), 18.6 (C-4), 0.2 (C-8)

F_p : 57-60 °C

IR: 3155, 2960, 2787, 2769, 1722, 1666, 1609, 1552, 1503, 1418, 1387, 1368, 1292, 1249, 1227, 1214, 1170, 1151, 1061, 1033, 1005, 941, 904, 884, 865, 843, 758, 695, 670, 605 cm^{-1}

MS: (ESI) $m/z = 337.1263$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 337.1291

8'-Methyl-6'-oxo-6'H-spiro[cyclohexan-1,2'-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-4-yl-pivalat (19)

20 (4.00 g, 11.98 mmol) und **18** (2.47 g, 12.48 mmol, 1.05 eq.) wurden in trockenem DCM (150 mL) vorgelegt. Es wurden zwei Tropfen TMSOTf hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (Hex/EE 5:1) gereinigt. Man erhielt **19** (2.15 g, 5.77 mmol, 49%) als einen weißen Feststoff.

DC: Hex/EE 3:1 $R_f = 0.36$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 6.89 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-6), 6.14 (d, $^4J = 0.9$ Hz, 1H, H-2), 5.04 - 4.95 (m, 1H, H-11), 2.38 - 2.32 (m, 3H, H-4), 2.19 - 1.90 (m, 8H, H-9), 1.26 - 1.17 (m, 9H, H-13)

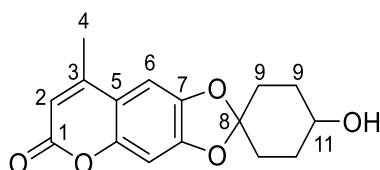
¹³C NMR (75 MHz, H-z, CDCl₃): 177.7 (C-11), 161.3 (C-1), 152.4 (C-3), 150.6 (C-7), 150.4 (C-5), 144.6 (C-7), 119.7 (C-8), 113.5 (C-5), 111.9 (C-2), 101.9 (C-6), 98.3 (C-6), 67.9 (C-11), 38.9 (C-12), 31.0 (C-9), 27.2 (C-9), 27.1 (C-13), 19.1 (C-4)

F_p: 215 - 218 °C

IR: 3056, 2968, 2940, 2872, 1719, 1623, 1583, 1493, 1452, 1399, 1376, 1344, 1266, 1249, 1228, 1206, 1165, 1150, 1138, 1118, 1065, 1043, 1000, 972, 921, 896, 846, 808, 769 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 372.1565 [M]⁺, berechnet: 372.1573

4-Hydroxy-8'-methyl-6'H-spiro[cyclohexan-1,2'-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6'-on (**22**)



Zu einer Lösung aus **19** (100 mg, 0.27 mmol) in MeOH (10 mL) wurde LiOH·H₂O (33 mg, 0.81 mmol, 3.0 eq.) hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mehrmals mit DCM extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **22** (73 mg, 0.25 mmol, 94%) als einen weißen Feststoff.

DC: Hex/EE 1:1 R_f = 0.24; DCM/MeOH 25:1 R_f = 0.39

¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.92 - 6.87 (m, 1H, H-6), 6.81 - 6.71 (m, 1H, H-6), 6.14 (d, ⁴J=0.9 Hz, 1H, H-2), 4.05 - 3.94 (m, 1H, H-11), 2.39 - 2.33 (m, 3H, H-4), 2.26 - 2.14 (m, 2H, H-9), 2.05 - 1.78 (m, 6H, H-9)

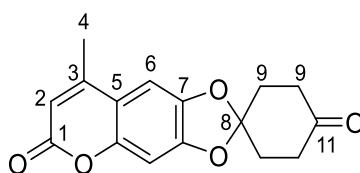
¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 161.5 (C-1), 152.6 (C-3), 150.9 (C-7), 150.4 (C-5), 144.8 (C-7), 120.1 (C-8), 113.4 (C-5), 111.8 (C-2), 101.9 (C-6), 98.2 (C-6), 66.4 (C-11), 31.2 (C-9), 30.7 (C-9), 19.1 (C-4)

F_p: 145 °C

IR: 3879, 3078, 2771, 2596, 2535, 2297, 2233, 1707, 1624, 1581, 1494, 1453, 1401, 1368, 1346, 1270, 1249, 1207, 1142, 1119, 1071, 1045, 979, 951, 924, 896, 854, 809, 770, 743 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 288.0990 [M]⁺, berechnet: 288.0998

8'-Methyl-6'H-spiro[cyclohexan-1,2'-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-4,6'-dion (**10**)



22 (413 mg, 1.43 mmol) wurde in trockenem DCM (50 mL) gelöst, DESS-MARTIN-Periodinan (668 mg, 1.58 mmol, 1.1 eq.) wurde hinzugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Es wurde dreimal mit gesät-

tigter $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (250 g/L) und NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 3:1) gereinigt. Man erhielt **10** (358 mg, 1.25 mmol, 87%) als einen weißen Feststoff.

DC: PE/EE 1:1 = 0.35

^1H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 6.97 (s, 1H, H-6), 6.83 (s, 1H, H-6), 6.18 - 6.15 (m, 1H, H-2), 2.73 - 2.60 (m, 4H, H-9), 2.44 - 2.33 (m, 7H, H-4, H-9)

^{13}C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 207.3 (C-11), 161.1 (C-1), 152.3 (C-3), 150.5 (C-7), 150.2 (C-5), 144.3 (C-7), 118.1 (C-8), 113.8 (C-5), 112.2 (C-2), 102.4 (C-6), 98.5 (C-6), 36.9 (C-9), 33.8 (C-9), 19.0 (C-4)

F_p: Zersetzung ab 180 °C

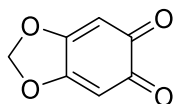
IR: 3436, 3120, 3043, 2934, 2903, 1781, 1708, 1621, 1579, 1493, 1450, 1417, 1400, 1364, 1348, 1326, 1273, 1238, 1149, 1115, 1059, 1043, 1008, 959, 930, 809, 776, 761, 745 cm^{-1}

MS: (EI) m/z = 286.0842 [M]⁺, berechnet: 286.0841

FREMY'S SALZ ($\text{K}_2\text{NO}_7\text{S}_2$)^[193]

NaNO_2 (36 g, 521.8 mmol) wurde in H_2O (100 mL) bei 0 °C vorgelegt. Eiswasser (200 g), Eisessig (20 mL) und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (50 g 263.5 mmol), gelöst in H_2O (100 mL), wurden unter Rühren zugegeben. Es wurde 60 min rühren lassen. Der hellbraunen Lösung wurden ca. 25 mL NH_3 -Lösung (25 %- ig) hinzugefügt ($10 \geq \text{pH} \leq 11$). Der pH-Wert wurde ca. 10 min nach der Zugabe vermessen. KMnO_4 (14 g, 88.7 mmol), gelöst in H_2O (400 mL), wurde über 10 min zugetropft. Der entstandene Braunstein wurde abgesaugt und zum lilafarbenen Filtrat wurde gesättigter KCl -Lösung (600 mL) über 1 h unter Eiskühlung zugetropft. Der ausgefallene orange Feststoff wurde abfiltriert, mit KCl -Lösung (200 mL), Ethanol (60 mL) und Aceton (300 mL) gewaschen (jeweils eisgekühlt und mit wenigen Tropfen NH_3 versetzt). Das erhaltene FREMY'S-SALZ (59 g, 219.9 mmol, 84 %) wurde über Nacht im Vakuum getrocknet.

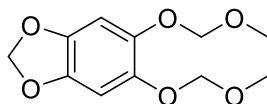
Benzo[d][1,3]dioxol-5,6-dion (29) ^[38,194]



Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , 1.79 g, 13.14 mmol, 0.55 eq.) wurde in H_2O (320 mL) bei 0 °C vorgelegt und mit FREMY'S SALZ ($\text{K}_2\text{NO}_7\text{S}_2$, 16.03 g, 59.73 mmol, 2.50 eq.) versetzt. Anschließend wurde Sesamol **28** (3.30 g, 23.89 mmol, 1.0 eq.), gelöst in MeOH (17 mL), innerhalb von 20 min. zugetropft. Es wurde 60 min. bei 0 °C gerührt. Der entstandene orange Niederschlag wurde mit H_2O gewaschen und mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrock-

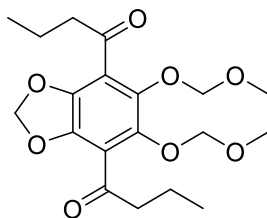
net und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **29** (3.42 g, 22.48 mmol, 94%) als einen orangen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

5,6-Bis(methoxymethoxy)benzo[d][1,3]dioxol (30)^[136,150]

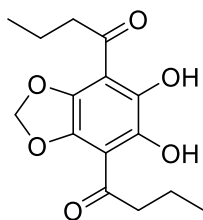


29 (3.68 g, 324.21 mmol) wurde in trockenem THF (250 mL) suspendiert. Eine Spatelspitze PtO₂ wurde hinzugegeben und es wurde 4 h unter H₂-Atmosphäre (1 bar) gerührt. Die nun blass orange Lösung wurde mit N₂ geflutet und auf -10 °C gekühlt. NaH (60% in Mineralöl, 3.29 g, 82.29 mmol, 3.4 eq.) wurde zugegeben, wodurch sich die Lösung nach kurzer Zeit blau verfärbte. Es wurde weitere 30 min gerührt. MOMBr (90%, 5.5 mL, 60.50 mmol, 2.5 eq.), gelöst in THF (10 mL), wurde über 15 min zugetropft, die Kühlung daraufhin entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Die weiße Suspension wurde mit H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mehrfach mit Et₂O extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 10:1 -> 5:1) gereinigt. Man erhielt **30** (5.88 g, 24.28 mmol, quant.) als ein weißer Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

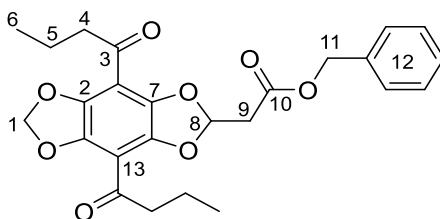
1,1'-(5,6-Bis(methoxymethoxy)benzo[d][1,3]dioxol-4,7-diyl)bis(butan-1-on) (31)^[37,150]



30 (2.33 g, 9.62 mmol) wurde in trockenem THF (150 mL) gelöst und auf -60 °C gekühlt. *n*-BuLi (1.6 M, 15.6 mL, 25.01 mmol, 2.6 eq.) wurde über 25 min zugetropft und es wurde für 1.5 h bei 0 °C gerührt. Trockenes CuI (4.58 g, 24.05 mmol, 2.5 eq.) wurde zugegeben und es wurde für weitere 1.5 h gerührt. Anschließend wurde zur nun schwarzen Lösung Butyrylchlorid (3.98 mL, 38.48 mmol, 4.0 eq.) zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Die gelbe Lösung wurde mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung gewaschen und mit Et₂O extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM:HCOOH 1000:1) gereinigt. Man erhielt **31** (2.91 g, 7.60 mmol, 79%) als gelben Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

1,1'-(5,6-Dihydroxybenzo[d][1,3]dioxol-4,7-diyl)bis(butan-1-on) (32)^[37,150]

31 (1.9 g, 4.97 mmol) und *p*TsOH·H₂O (10 mg, 0.05 mmol, 0.01 eq.) wurden in MeOH (40 mL) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit H₂O/DCM gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 20:1 → 10:1) gereinigt. Man erhielt **32** (1.25 mg, 4.24 mmol, 85%) als einen roten Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

Benzyl-2-(4,8-dibutyrylbenzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-2-yl)acetat (33)^[38,150]

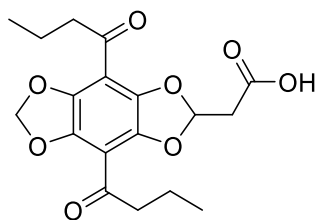
32 (500 mg, 1.70 mmol) und **11** (300 mg, 1.87 mmol, 1.1 eq.) wurden in trockenem DCM (100 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von DMAP (311 mg, 2.55 mmol, 1.5 eq.) wurde die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (PE/EE 10:1 → 3:1) gereinigt. Man erhielt **33** (717 mg, 1.58 mmol, 93%) als einen orangen Feststoff.

¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 7.45 - 7.30 (m, 5H, H-12), 6.68 (t, ³J=5.0 Hz, 1H, H-8), 6.12 - 6.08 (m, 2H, H-1), 6.10 (s, 2H, H-11), 5.19 (s, 2H, H-), 3.13 (d, ³J=4.9 Hz, 2H, H-9), 2.85 (t, ³J=7.2 Hz, 4H, H-4), 1.76 - 1.61 (m, 4H, H-5), 1.00 - 0.94 (m, 6H, H-6)

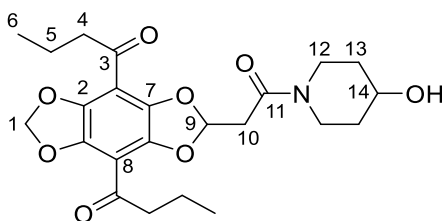
¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 196.2 (C-3), 167.3 (C-10), 157.2 (C-2), 141.2 (C-7), 140.4 (C-12), 128.6 (C-12), 128.5 (C-12), 128.3 (C-12), 109.8 (C-8), 102.6 (C-1), 67.0 (C-11), 45.6 (C-4), 40.0 (C-9), 17.1 (C-5), 13.7 (C-6)

F_p: 76 °C

MS: (EI) m/z = 454.1625 [M]⁺, berechnet: 454.1628 C₂₅H₂₆O₈

2-(4,8-Dibutyrylbenzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-2-yl)essigsäure (24)^[38,150]

33 (608 mg, 1.34 mmol) wurde in MeOH (70 mL) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Pd/C (10%) wurde die Suspension unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, wurde die Suspension über Celite® abfiltriert, mit MeOH gewaschen und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1 -> 10:1) gereinigt und man erhielt **24** (356 mg, 0.98 mmol, 73%) als einen orangen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

1,1'-(2-(2-(4-Hydroxypiperidin-1-yl)-2-oxoethyl)benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-4,8-diyl)bis(butan-1-on) (34)

24 (150 mg, 0.41 mmol) wurde in trockenem DCM (40 mL) gelöst und es wurden 4-Hydroxypiperidin (46 mg, 0.45 mmol, 1.1 eq.), DCC (102 mg, 0.49 mmol, 1.2 eq.) und HOBt (67 mg, 0.49 mmol, 1.2 eq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt und mit 0.1N HCl, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **34** (182 mg, 0.41 mmol, quant.) als einen orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 R_f = 0.11

¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.71 (t, ³J=5.0 Hz, 1H, H-9), 6.08 (s, 2H, H-1), 4.14 - 3.82 (m, 2H, H-12, H-14), 3.82 - 3.61 (m, 1H, H-12), 3.37 - 3.17 (m, 2H, H-12), 3.10 (d, ³J=4.9 Hz, 2H, H-10), 3.03 - 2.70 (m, 4H, H-4), 1.97 - 1.81 (m, 2H, H-13), 1.77 - 1.61 (m, 4H, H-5), 1.61 - 1.44 (m, 2H, H-13), 0.95 (t, ³J=7.4 Hz, 6H, H-6)

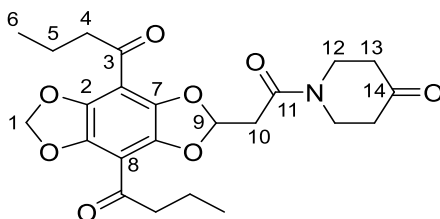
¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 196.4 (C-3), 165.3 (C-11), 140.9 (C-2), 140.7 (C-7), 111.4 (C-9), 110.0 (C-8), 102.5 (C-1), 66.7 (C-14), 45.6 (C-4), 43.1 (C-12), 39.1 (C-12), 38.3 (C-10), 34.3 (C-13), 33.7 (C-13), 17.1 (C-5), 13.7 (C-6)

F_p: 90-91 °C

IR: 3419, 2960, 2930, 2934, 2875, 1684, 1630, 1473, 1435, 1283, 1242, 1114, 1063, 951, 751, 579 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 447.1896 [M]^+$, berechnet: 447.1893 $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_8$

1,1'-(2-(2-Oxo-2-(4-oxopiperidin-1-yl)ethyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis[[1,3]dioxol)-4,8-diyl)bis(butan-1-one) (26)



Variante 1: Trockenes DMSO (33 μL , 0.46 mmol, 2.0 eq.) wurde in trockenem DCM (10 mL) gelöst und auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Oxalylchlorid (1.4 mL, 0.34 mmol, 1.5 eq.) wurde tropfenweise zugegeben und 30 min gerührt. **34** (102 mg, 0.28 mmol), gelöst in trockenem DCM (3 mL), wurde tropfenweise zugegeben und für 30 min gerührt. Trockenes NEt_3 (158 μL , 1.1 mmol, 5 eq.) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch nach Entfernen der Kühlung 30 min gerührt. Die Lösung wurde mit DCM versetzt und mit 1N HCl und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **26** (59 mg, 0.13 mmol, 58%) als einen orangen Feststoff.

Variante 2: **34** (48 mg, 0.11 mmol) wurde in trockenem DCM (5 mL) gelöst, DESS-MARTIN-Periodinan (68 mg, 0.16 mmol, 1.5 eq.) wurde hinzugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Es wurde dreimal mit gesättigter $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (250 g/L) und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **26** (28 mg, 0.06 mmol, 58%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.3$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 6.74 (t, $^3J=4.9$ Hz, 1H, H-9), 6.10 (s, 2H, H-1), 3.94 (t, $^3J=6.3$ Hz, 2H, H-12), 3.81 (t, $^3J=6.1$ Hz, 2H, H-12), 3.20 (d, $^3J=4.9$ Hz, 2H, H-10), 2.88 (t, $^3J=7.2$ Hz, 4H, H-4), 2.60 - 2.48 (m, 4H, H-13), 1.70 (sxt, $^3J=7.3$ Hz, 5H, H-5), 0.96 (t, $^3J=7.4$ Hz, 7H, H-6)

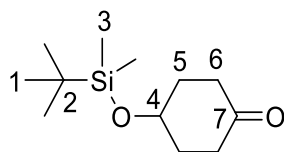
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 206.1 (C-14), 196.2 (C-3), 165.8 (C-11), 141.0 (C-2), 140.6 (C-7), 111.1 (C-9), 110.1 (C-8), 102.5 (C-1), 45.6 (C-4), 44.4 (C-12), 41.0 (C-12), 40.9 (C-13), 40.6 (C-13), 38.6 (C-10), 17.1 (C-5), 13.7 (C-6)

F_p : 128-129 $^\circ\text{C}$

IR: 3623, 3421, 3188, 2960, 2930, 2874, 2754, 2601, 2547, 2292, 1706, 1681, 1468, 1435, 1416, 1399, 1367, 1347, 1276, 1242, 1218, 1126, 1081, 1038, 986, 960, 931, 737, 663, 620 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 445.1732 [M]^+$, berechnet: 445.1737 $C_{23}H_{27}NO_8$

4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)cyclohexan-1-on (50)^[195]



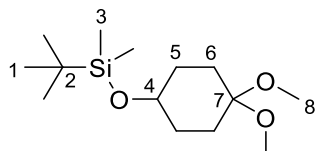
17 (10.5 g, 92.0 mmol) wurde in DCM (150 mL) gelöst. *tert*-Butyldimethylchlorsilan (TBDMSCl, 18.0 g, 119.6 mmol, 1.3 eq.) und Imidazol (9.4 g, 138.0 mmol, 1.5eq.) wurden zugegeben und es wurde für 1h gerührt. Hexan wurde zugegeben und der Feststoff über Kieselgel abfiltriert. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **50** (21 mg, 91.9 mmol, quant.) als ein farbloses Öl.

DC: Hex/EE 10:1 $R_f = 0.36$

¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, $CDCl_3$): 4.17 - 4.08 (m, 1H, H-4), 2.76 - 2.59 (m, 2H, H-6), 2.31 - 2.14 (m, 2H, H-6), 2.00 - 1.82 (m, 4H, H-5), 0.91 (s, 9H, H-1), 0.09 (s, 6H, H-2)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, $CDCl_3$): 211.7 (C-7), 65.9 (C-4), 36.9 (C-5), 34.2 (C-6), 25.7 (C-1), 18.0 (C-2), -4.9 (C-3)

***tert*-Butyl((4,4-dimethoxycyclohexyl)oxy)dimethylsilan (52)**



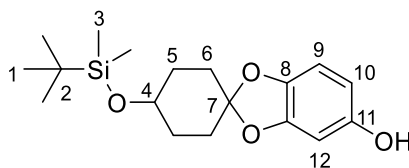
50 (1.5 g, 6.57 mmol) und *p*TsOH·H₂O (12.5 mg, 0.07 mmol, 0.01 eq.) wurden in Trimethoxyethan/MeOH 5:1 (24 mL) bis zum vollständigen Umsatz (1 h), überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, gerührt. NEt₃ (100 μ L) wurde zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (Hex:EE 20:1) gereinigt. Man erhielt **52** (1.8 g, 6.56 mmol, quant.) als ein farbloses Öl.

DC: Hex/EE 10:1 $R_f = 0.53$

¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, C_6D_6): 3.81 - 3.65 (m, 1H, H-7), 3.11 - 3.00 (m, 6H, H-8), 2.04- 1.83 (m, 2H, H-6), 1.71 - 1.46 (m, 6H, H-6, H-5), 1.05 - 0.92 (m, 9H, H-1), 0.11 - (-0.01) (m, 6H, H-3)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, C_6D_6): 100.0 (C-7), 69.3 (C-4), 47.9 (C-8), 47.5 (C-8), 32.0 (C-5), 29.4 (C-6), 26.4 (C-1), -4.2 (C-3)

IR: 2951, 2930, 2856, 1472, 1462, 1435, 1375, 1249, 1236, 1132, 1102, 1051, 1019, 935 914, 905, 865, 850, 833, 809, 771, 675 cm^{-1}

4'-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)spiro[benzo[*d*][1,3]dioxol-2,1'-cyclohexan]-5-ol (51)

In einer Destillationsapparatur wurden trockenes Toluol (150 mL) und Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (17 mg, 0.07 mmol, 0.01 eq.) auf 80 °C erhitzt. 1,2,4-Benzenetriol (835 mg, 6.62 mmol) wurde hinzugeben und es wurde zum Sieden erhitzt. **50** (2 g, 7.26 mmol, 1.10 eq.) wurde in 3 Portionen alle 15 min hinzugegeben. Es wurde eine weitere Stunde destilliert. Nach Abkühlen der Lösung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer einrotiert und der erhaltene Rückstand mittels Flashchromatographie (PE/EE 10:1) gereinigt. Man erhielt **51** (2.1 g, 6.30 mmol, 95%) als einen beigeen Feststoff.

DC: Hex/EE 10:1 $R_f = 0.18$

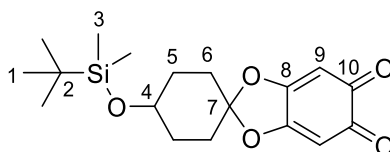
¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.60 - 6.54 (m, 1H, H-9), 6.39 - 6.33 (m, 1H, H-12), 6.21 (dd, $^4J=2.4$ Hz, $^3J=8.3$ Hz, 1H, H-10), 3.99 - 3.91 (m, 1H, H-4), 2.24 - 2.11 (m, 2H, H-), 1.94 - 1.70 (m, 6H, H-5), 0.92 (s, 9H, H-2), 0.09 (s, 6H, H-3)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 150.2 (C-11), 148.1 (C-8), 141.5 (C-8), 118.6 (C-7), 107.8 (C-9), 105.8 (C-10), 98.1 (C-12), 66.4 (C-4), 31.1 (C-6), 30.5 (C-5), 25.8 (C-1), 18.1 (C-2), -4.8 (C-3)

F_p: 80-82 °C

IR: 3319, 3262, 3088, 2953, 2931, 2855, 2709, 1636, 1618, 1478, 1437, 1374, 1322, 1249, 1198, 1144, 1112, 1062, 1043, 1014, 964, 947, 896, 853, 830, 776, 712, 677, 641, 608 cm⁻¹

MS: (EI) $m/z = 336.1763$ [M]⁺, berechnet: 336.1757

4'-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)spiro[benzo[*d*][1,3]dioxol-2,1'-cyclohexan]-5,6-dion (53)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄, 1.4 g, 10.29 mmol, 0.55eq.) wurde in 90 mL H₂O bei 0 °C vorgelegt und mit FREMY'S SALZ (K₂NO₇S₂, 12.54 g, 37.40 mmol, 2.50 eq.) versetzt. Anschließend wurde **51** (6.29 g, 18.70 mmol, 1.0 eq.), gelöst in MeOH/Aceton 1:3 (20 mL), innerhalb von 15 min. zugetropft. Es wurde zunächst 4h bei 0 °C und anschließend bei langsamer Erwärmung auf RT über Nacht gerührt. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde mit H gewaschen und mehrmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **53** (2.1 mg, 6.30 mmol, 95%) als einen orangen Feststoff.

DC: Hex/EE 3:1 $R_f = 0.29$

¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 5.94 (s, 2H, H-9), 4.10 - 3.99 (m, 1H, H-4), 2.44 – 2.27 (m, 2H, H-6), 1.90 - 1.76 (m, 6H, H-5, H-6), 0.91 (s, 9H, H-1), 0.17 – 0.01 (m, 6H, H-3)

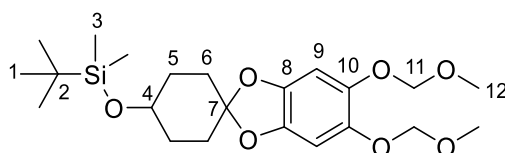
¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 177.9 (C-10), 161.0 (C-8), 125.0 (C-7), 101.1 (C-9), 101.0 (C-9), 64.7 (C-4), 30.8 (C-6), 30.6 (C-5), 25.7 (C-1), 18.0 (C-2), -4.9 (C-3)

F_p: 197-199 °C

IR: 3088, 3070, 2953, 2929, 2883, 2856, 1722, 1654, 1469, 1438, 1399, 1360, 1334, 1292, 1233, 1200, 1155, 1134, 1119, 1064, 1047, 1018, 962, 898, 866, 844, 816, 772, 631, 619 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 350.1569 [M]⁺, berechnet: 350.1550

((5,6-Bis(methoxymethoxy)spiro[benzo[*d*][1,3]dioxol-2,1'-cyclohexan]-4'-yl)oxy)(*tert*-butyl)-dimethylsilan (54)



53 (1.16 g, 3.32 mmol) wurde in trockenem THF (150 mL) suspendiert. Eine Spatelspitze PtO₂ wurde hinzugegeben und es wurde 2h unter H₂-Atmosphäre (1 bar) gerührt. Die nun blass orangene Lösung wurde unter N₂-Atmosphäre gebracht und auf -10 °C gekühlt. NaH (60% in Mineralöl, 451.36 mg, 11.29 mmol, 3.4 eq.) wurde zugegeben, wodurch sich die Lösung nach kurzer Zeit blau verfärbte. Es wurde weitere 30 min gerührt. MOMBr (903 μ L, 9.96 mmol, 3.0 eq.), gelöst in THF (10 mL), wurde über 15 min zugetropft, daraufhin wurde die Kühlung entfernt und über Nacht bei RT gerührt. Die weiße Suspension wurde mit H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mehrfach mit Et₂O extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 10:1) gereinigt. Man erhielt **54** (1.34 g, 3.03 mmol, 91%) als ein farbloses Öl.

DC: Hex/EE 3:1 R_f = 0.64

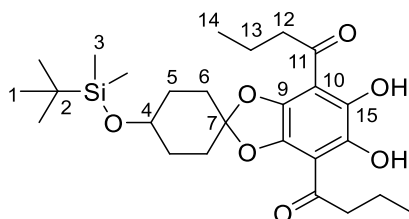
¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.68 (s, 2H, H-6), 5.10 (s, 4H, H-11), 3.99 - 3.88 (m, 1H, H-4), 3.53 (s, 6H, H-12), 2.27 - 2.10 (m, 2H, H-6), 1.95 - 1.69 (m, 6H, H-5, H-6), 0.95 - 0.88 (m, 9H, H-1), 0.08 (s, 6H, H-3)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 142.4 (C-8), 142.4 (C-8), 141.4 (C-10), 141.3 (C-10), 118.8 (C-7), 100.8 (C-9), 100.7 (C-9), 96.9 (C-11), 66.4 (C-4), 56.1 (C-12), 31.1 (C-6), 30.5 (C-5), 25.8 (C-1), 18.1 (C-2), -4.8 (C-3)

IR: 2951, 2930, 2894, 2855, 1491, 1377, 1251, 1208, 1148, 1071, 1043, 962, 922, 874, 835, 772, 684, 623, 477 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 440.2209 [M]⁺, berechnet: 440.2230 C₂₂H₃₆O₇Si

1,1'-(4'-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5,6-dihydroxyspiro[benzo[*d*][1,3]dioxol-2,1'-cyclohexan]-4,7-diyl)bis(butan-1-on) (58)



54 (1.33 g, 3.02 mmol) wurde in trockenem THF (100 mL) gelöst und auf $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. *n*-BuLi (1.6 M, 4.91 mL, 7.85 mmol, 2.6 eq.) wurde über 10 min hinzutropft und es wurde für 1.5 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Trockenes CuI (1.44 g, 7.55 mmol, 2.5 eq.) wurde hinzugegeben und es wurde für weitere 1.5 h gerührt. Anschließend wurde zur nun schwarzen Lösung Butyrylchlorid (1.25 mL, 12.08 mmol, 4.0 eq.) hinzugegeben und 2 h gerührt. Die gelbe Lösung wurde mit einer gesättigten NH_4Cl -Lösung gewaschen und mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt, wobei die MOM-Schutzgruppen abgespalten wurden. Der rote Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 30:1) gereinigt. Man erhielt **58** (1.12 g, 2.27 mmol, 75%) als einen roten Feststoff.

DC: PE/EE 7:1 $R_f = 0.53$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 11.73 (s, 1H, OH), 11.70 (s, 1H, OH), 4.05 - 3.95 (m, 1H, H-4), 3.04 - 2.88 (m, 4H, H-12), 2.38 - 2.15 (m, 4H, H-5), 2.02 - 1.55 (m, 8H, H-6, H-13), 1.06 - 0.96 (m, 6H, H-14), 0.94 - 0.90 (m, 9H, H-1), 0.13 - 0.03 (m, 6H, H-3)

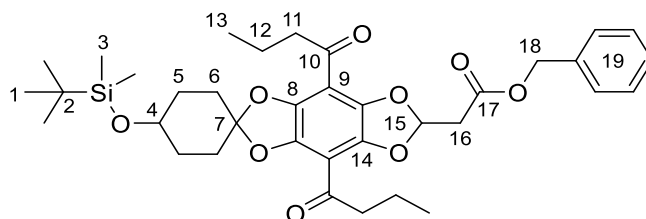
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 205.3 (C-11), 143.6 (C-9), 138.6 (C-15), 120.1 (C-7), 109.8 (C-10), 66.0 (C-4), 45.5 (C-12), 31.3 (C-5), 30.5 (C-6), 25.8 (C-1), 18.4 (C-2), 17.6 (C-13), 13.7 (C-14), -4.8 (C-3)

F_p : 103-104 $^{\circ}\text{C}$

IR: 3322, 2970, 2932, 2881, 1735, 1631, 1448, 1380, 1345, 1231, 1177, 1046, 878, 846, 750, 675, 582, 465 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 492.2533$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 492.2543 $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Si}$

Benzyl-2-(4'-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4,8-dibutyrylspiro[benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dioxol)-2,1'-cyclohexan]-6-yl)acetat (59)



58 (580 mg, 1.18 mmol) und **11** (207 mg, 1.29 mmol, 1.1 eq.) wurden in trockenem DCM (30 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von DMAP (216 mg, 1.77 mmol, 1.5 eq.) wurde die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (PE/EE 10:1 → 3:1) gereinigt. Man erhielt **59** (439 mg, 0.67 mmol, 57%) als einen orangen, harzartigen Feststoff.

DC: PE/EE 7:1 $R_f = 0.19$

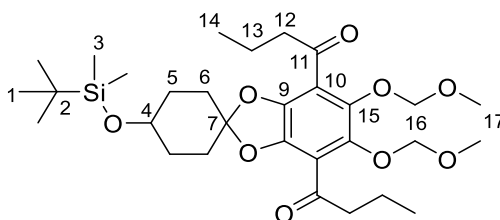
$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 7.43 - 7.31 (m, 5H, H-19), 6.65 (t, $^3J=5.0$ Hz, 1H, H-15), 5.19 (s, 2H, H-18), 4.02 - 3.93 (m, 1H, H-4), 3.11 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-16), 2.92 - 2.77 (m, 4H, H-11), 2.32 - 2.19 (m, 2H, H-6), 2.00 - 1.77 (m, 6H, H-6, H-5), 1.74 - 1.64 (m, 4H, H-12), 1.06 - 0.81 (m, 15H, H-13, H-1), 0.13 - 0.04 (m, 6H, H-3)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 196.5 (C10-), 196.4 (C-10), 167.5 (C-17), 141.2 (C-14), 141.1 (C-14), 139.6 (C-8), 135.3 (C-19), 128.6 (C-19), 128.4 (C-19), 128.2 (C-19), 121.1 (C-9), 110.1 (C-7), 109.5 (C-15), 66.9 (C-18), 66.0 (C-4), 45.6 (C-11), 40.0 (C-16), 31.1 (C-6), 30.4 (C-5), 25.8 (C-1), 18.1 (C-2), 17.2 (C-12), 13.7 (C-13), -4.8 (C-3)

IR: 2955, 2930, 2856, 1739, 1686, 1471, 1438, 1376, 1282, 1172, 1101, 1043, 1002, 835, 773, 735, 696, 679, 624, 580 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 652.3062$ [M] $^+$, berechnet: 652.3068 $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_9\text{Si}$

1,1'-(4'-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-5,6-bis(methoxymethoxy)spiro[benzo[*d*]-[1,3]dioxol-2,1'-cyclohexan]-4,7-diyl)bis(butan-1-on) (55)



54 (1.52 g, 3.45 mmol) wurde in trockenem THF (100 mL) gelöst und auf -60 °C gekühlt. *n*-BuLi (1.6 M, 5.61 mL, 8.98 mmol, 2.6 eq.) wurde über 10 min hinzuge tropft und es wurde für 1.5 h bei 0 °C gerührt. Trockenes CuI (1.64 g, 8.64 mmol, 2.5 eq.) wurde hinzugegeben und es wurde für weitere

1.5 h gerührt. Anschließend wurde zur nun schwarzen Lösung Butyrylchlorid (1.43 mL, 13.82 mmol, 4.0 eq.) hinzugegeben und 2 h gerührt. Die gelbe Lösung wurde mit einer gesättigten NH_4Cl -Lösung gewaschen und mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet. Etwas NaCO_3 wurde zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 30:1) gereinigt. Man erhielt **55** (1.80 g, 3.10 mmol, 90%) als ein hellgelbes Öl.

DC: PE/EE 5:1 $R_f = 0.26$

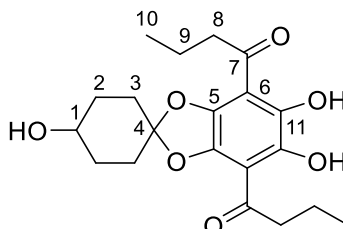
$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 5.01 (s, 4H, H-16), 3.95 (br. s., 1H, H-4), 3.47 (s, 6H, H-17), 2.93 - 2.77 (m, 4H, H-12), 2.27 - 2.09 (m, 2H, H-6), 1.99 - 1.47 (m, 10H, H-6, H-5, H-13), 1.03 - 0.93 (m, 6H, H-14), 0.91 (s, 9H, H-1), 0.07 (s, 6H, H-3)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 162.3 (C-11), 140.9 (C-9, C-15), 121.2 (C-10), 100.5 (C-16), 66.0 (C-4), 57.7 (C-17), 46.2 (C-12), 31.0 (C-5), 30.5 (C-6), 25.8 (C-1), 18.1 (C-25), 17.2 (C-13), 13.7 (C-14), -4.9 (C-3)

IR: 3095, 2959, 2934, 2879, 2858, 1738, 1708, 1462, 1433, 1377, 1359, 1280, 1252, 1242, 1213, 1158, 1138, 1112, 1094, 1079, 1054, 1003, 939, 859, 837, 813, 774, 676 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 580.3088$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 580.3068 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_9\text{Si}$

1,1'-(4',5,6-Trihydroxyspiro[benzo[d][1,3]dioxol-2,1'-cyclohexan]-4,7-diyl)bis(butan-1-on) (**56**)



55 (300.0 mg, 516.0 μmol) und $p\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1.3 mg, 6.0 μmol , 0.01 eq.) wurden in MeOH (7 mL) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$ gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **56** (190.0 mg, 502.0 μmol , quant.) als einen roten Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.25$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 4.14 - 3.93 (m, 1H, H-1), 3.10 - 2.85 (m, 4H, H-8), 2.34 - 2.18 (m, 2H, H-3), 2.06 - 1.79 (m, 6H, H-3, H-2), 1.79 - 1.64 (m, 4H, H-9), 1.12 - 0.92 (m, 6H, H-10)

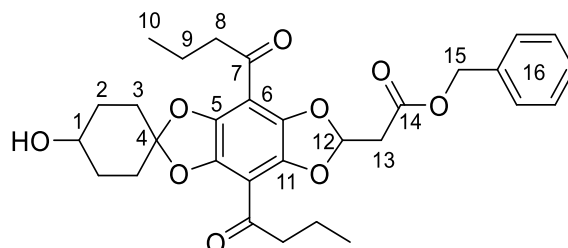
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 205.2 (C-7), 143.6 (C-11), 138.4 (C-5), 119.6 (C-6), 109.7 (C-4), 66.3 (C-1), 45.5 (C-8), 45.5 (C-8), 30.9 (C-2, C-3), 17.4 (C-9), 17.4 (C-9), 13.8 (C-10)

F_p: 190 - 192 °C

IR: 3249, 3041, 2963, 2938, 2874, 1631, 1450, 1377, 1339, 1288, 1272, 1233, 1177, 1147, 1117, 1065, 1056, 1034, 1006, 979, 953, 938, 909, 878, 759 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 378.1686$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 378.1679 $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_7$

Benzyl-2-(4,8-dibutyryl-4'-hydroxyspiro[benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dioxol)-2,1'-cyclohexan]-6-yl)acetat (57)



Variante 1: **59** (180 mg, 0.27 mmol) wurde in ACN (2 mL) gelöst. HF (48%, 30 μL , 0.83 mmol, 3 eq.) wurde hinzugegeben und es wurde 2h gerührt. Die Lösung wurde mit NaHCO_3 gequenched. DCM wurde zugegeben und die organische Phase wurde mit NaHCO_3 gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **57** (148 mg, 0.27 mmol, quant.) als einen orangen, harzartigen Feststoff.

Variante 2: Zu einer Lösung aus **56** (336 mg, 681 μmol) und **11** (120 mg, 750 μmol , 1.1 eq.) in trockenem DCM (8 mL) wurde DMAP (125 mg, 1.02 mmol, 1.5 eq.) zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **57** (406 mg, 621 μmol , 91%) als einen orangen, harzartigen Feststoff.

DC: PE/EE 1:1 $R_f = 0.34$

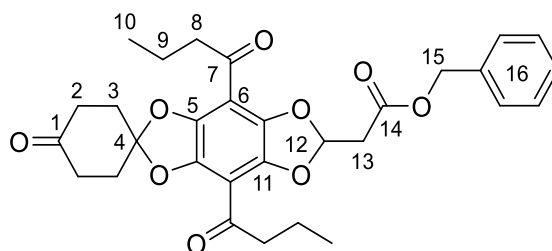
$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 7.36 (s, 5H, H-16), 6.66 (t, $^3J=5.0$ Hz, 1H, H-12), 5.20 (s, 2H, H-15), 4.04 - 3.93 (m, 1H, H-1), 3.11 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-13), 2.91 - 2.78 (m, 4H, H-8), 2.30 - 2.14 (m, 2H, H-3), 2.04 - 1.89 (m, 4H, H-3, H-2), 1.88 - 1.80 (m, 2H, H-2), 1.75 - 1.65 (m, 4H, H-9), 1.04 - 0.92 (m, 6H, H-10)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 196.3 (C-7), 167.5 (C-14), 135.1 (C-16), 128.6 (C-16), 128.4 (C-16), 128.2 (C-16), 120.4 (C-6), 109.5 (C-12), 66.9 (C-15), 66.5 (C-1), 45.6 (C-8), 40.0 (C-13), 31.1 (C-3), 30.9 (C-2), 17.2 (C-9), 13.8 (C-10)

IR: 3525, 2960, 2938, 2874, 1737, 1684, 1439, 1370, 1282, 1174, 1101, 1051, 993, 750, 698, 603 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 538.2211$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 538.2203 $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_9$

Benzyl-2-(4,8-dibutyryl-4'-oxospiro[benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-2,1'-cyclohexan]-6-yl)acetat (27)



57 (148 mg, 0.27 mmol) wurde in trockenem DCM (10 mL) gelöst, DESS-MARTIN-Periodinan (175 mg, 0.41 mmol, 1.5 eq.) wurde hinzugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Es wurde dreimal mit gesättigter NaHCO₃/Na₂S₂O₃-Lösung (250 g/L) und NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **27** (89 mg, 0.17 mmol, 60%) als einen orangen, harzartigen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 50:1 R_f = 0.30

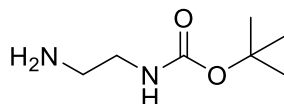
¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 7.36 (s, 5H, H-16), 6.69 (t, ³J=5.0 Hz, 1H, H-12), 5.20 (s, 2H, H-15), 3.13 (d, ³J=5.1 Hz, 2H, H-13), 2.85 (t, ³J=7.2 Hz, 4H, H-8), 2.70 - 2.57 (m, 4H, H-3), 2.48 - 2.34 (m, 4H, H-2), 1.78 - 1.61 (m, 4H, H-9), 0.96 (t, ³J=7.4 Hz, 6H, H-10)

¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 207.5 (C-1), 196.1 (C-7), 167.4 (C-14), 140.5 (C-5), 140.3 (C-11), 135.1 (C-16), 128.6 (C-16), 128.5 (C-16), 128.3 (C-16), 118.5 (C-6), 110.2 (C-4), 109.7 (C-12), 67.0 (C-15), 45.6 (C-8), 40.0 (C-13), 37.1 (C-3), 33.7 (C-2), 17.1 (C-9), 13.8 (C-10)

IR: 3033, 2963, 2936, 2875, 1739, 1722, 1687, 1472, 1455, 1439, 1416, 1401, 1369, 1285, 1217, 1177, 1118, 1104, 1065, 1046, 989, 889, 752, 699 cm⁻¹

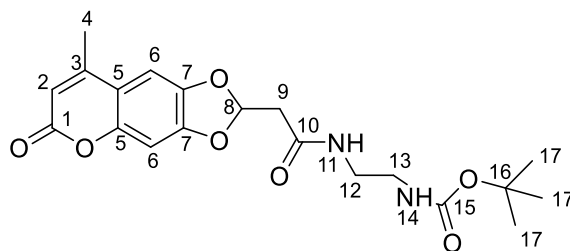
MS: (EI) m/z = 536.2066 [M]⁺, berechnet: 536.2046 C₃₀H₃₂O₉

tert-Butyl-(2-aminoethyl)carbamat (60)^[196]



Eine Lösung aus Boc-Anhydrid (1.91 mL, 8.32 mmol) in DCM (25 mL) wurde über 2 h tropfenweise zu einer Lösung aus Ethylendiamin (3.34 mL, 49.92 mmol, 6.0 eq.) in DCM (100 mL) gegeben. Es wurde für weitere 24 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel daraufhin abrotiert. Wasser (200 mL) wurde hinzugegeben und der entstandene weiße Feststoff (Di-tert-butylethan-1,2-diylidcarbamate) abfiltriert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM (je 150 mL) extrahiert, die organische Phase mit Mg₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. **60** wurde als ein farbloses Öl (1.16 g, 7.27 mmol, 87%) erhalten. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

***tert*-Butyl(2-(2-(8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)acetamido)ethyl)-carbamate (61)**



61 (390 mg, 1.49 mmol) und *tert*-Butyl(2-aminoethyl)carbamate (**60**, 262 mg, 1.64 mmol, 1.1 eq.) wurden in trockenem DCM (70 mL) gelöst. DCC (338 mg, 1.64 mmol, 1.1 eq.) und HOBt (221 mg, 1.64 mmol, 1.1 eq.) wurden hinzugegeben und es wurde bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit 1N HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **61** (544 mg, 1.35 mmol, 90%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.25$

¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.95 – 6.87 (m, 2H, H-6, H-11), 6.72 (s, 1H, H-6), 6.62 (t, ³J=5.2 Hz, 1H, H-8), 6.10 - 6.15 (m, 1H, H-2), 5.13 - 5.01 (m, 1H, 14), 3.35 - 3.46 (m, 2H, H-12), 3.23 - 3.35 (m, 2H, H-13), 2.90 (d, ³J=5.1 Hz, 2H, H-9), 2.32 – 2.33 (m, 3H, H-4), 1.43 (s, 9H, H-17)

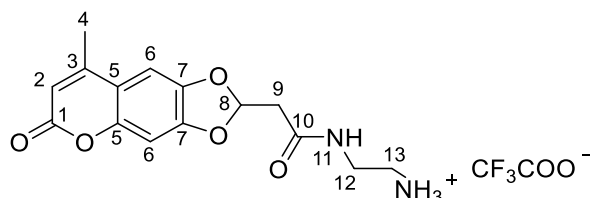
¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 167.1 (C-10), 161.2 (C-1), 157.0 (C-15), 152.6 (C-3), 150.5 (C-7), 150.3 (C-5), 144.6 (C-7), 113.8 (C-5), 112.1 (C-2), 110.6 (C-8), 102.1 (C-6), 98.3 (C-6), 79.8 (C-16), 41.9 (C-9), 41.0 (C-12), 40.0(C-13), 28.3 (C-17), 19.1 (C-4)

F_p: 123 – 124.5 °C

IR: 3624, 3330, 3096, 2740, 2683, 1837, 1732, 1682, 1636, 1583, 1561, 1527, 1491, 1450, 1387, 1365, 1347, 1324, 1264, 1203, 1169, 1142, 1098, 1074, 1047, 919, 856, 805, 784, 760 cm⁻¹

MS: (ESI) $m/z = 405.1659$ [M+H]⁺, berechnet: 405.1662

N-(2-Aminoethyl)-2-(8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)acetamid (62)



61 (95 mg, 0.24 mmol) wurde in DCM/TFA (1:1; 5 mL) gelöst und für 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer und im Hochvakuum (1·10⁻³ mbar) entfernt. Man erhielt **62** (98 mg, 0.24 mmol, quant.) als einen weißen harzartigen Feststoff.

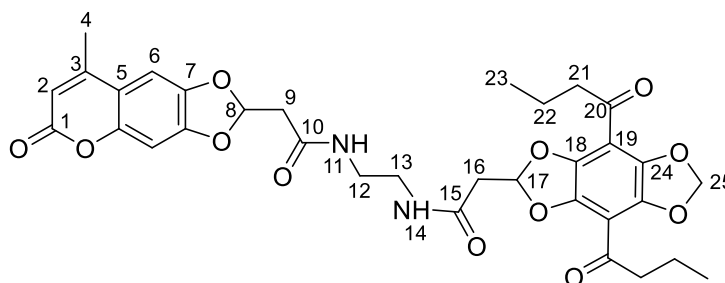
¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, MeOD-*d*₄): 7.13 (s, 1H, H-6), 6.84 (s, 1H, H-6), 6.65 (t, ³*J*=5.2 Hz, 1H, H-8), 6.16 - 6.19 (m, 1H, H-2), 3.50 (t, ³*J*=6.1 Hz, 2H, H-12), 3.07 (t, ³*J*=6.0 Hz, 2H, H-13), 2.98 (d, ³*J*=5.3 Hz, 2H, H-9), 2.38 – 2.41 (m, 3H, H-4)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, MeOD-*d*₄): 171 (C-10), 164 (C-1), 156 (C-3), 152 (C-7), 152 (C-5), 146 (C-7), 115 (C-5), 113 (C-2), 112 (C-8), 104 (C-6), 99 (C-6), 42 (C-9), 41 (C-13), 38 (C-12), 19 (C-4)

IR: 2999, 2987, 2941, 1633, 1581, 1493, 1454, 1390, 1348, 1268, 1202, 1080, 1047, 1035, 927, 859, 836, 798, 721, 705 cm⁻¹

MS: (EI) *m/z* = 304.1068 [M]⁺ berechnet für die Base C₁₅H₁₆N₂O₅, berechnet: 304.1059

2-(4,8-Dibutyrylbenzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dioxol)-2-yl)-N-(2-(2-(8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-*g*]chromen-2-yl)acetamido)ethyl)acetamid (64)



62 (20 mg, 0.05 mmol) wurde in trockenem DCM (5 mL) suspendiert. Oxalylchlorid (47 μ L, 0.55 mmol, 10 eq.) wurde vorsichtig hinzugegossen und 4 h bei RT gerührt. Das Säurechlorid, welches sich vollständig in DCM löst, wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde es in trockenem DCM (3 mL) gelöst und vorsichtig zu einer Lösung aus **x** (23 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq.) und DIPEA (96 μ L, 0.55 mmol, 10 eq.) in trockenem DCM (2 mL) getropft. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wurde der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **64** (34 mg, 0.05 mmol, 94 %) als einen orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 10:1 *R_f* = 0.46

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): 7.28 – 7.27 (m, 1H, H-11), 6.88 (s, 1H, H-6), 6.71 (s, 1H, H-6), 6.66 (t, ³*J*=5.4 Hz, 1H, H-17), 6.58 (t, ³*J*=5.3 Hz, 1H, H-8), 6.56 – 6.50 (m, 1H, H-14), 6.12 (d, ⁴*J*=0.8 Hz, 1H, H-2), 6.09 (s, 2H, H-25), 3.60 – 3.38 (m, 4H, H-12, H-13), 3.01 (d, ³*J*=5.5 Hz, 2H, H-9), 2.93 (d, ³*J*=5.5 Hz, 2H, H-16), 2.87 – 2.81 (m, 4H, H-21), 2.31 (d, ⁴*J*=0.9 Hz, 3H, H-4), 1.72 - 1.54 (m, 4H, H-22), 1.00 - 0.85 (m, 6H, H-23)

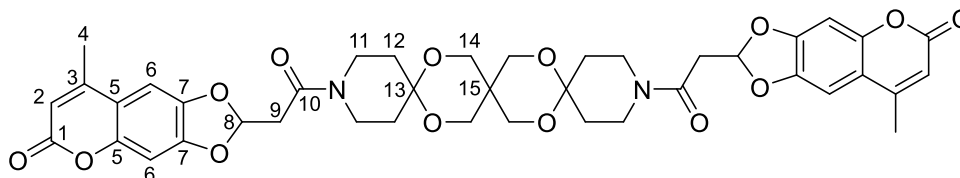
¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 196.0 (C-20), 167.7 (C-10), 167.6 (C-15), 167.0 (1), 152.4 (C-3), 150.4 (C-7), 140.5 (C-5), 140.4 (C-7), 113.7 (C-19), 112.1 (C-2), 110.7 (C-17, C-8), 110.0 (C-5), 102.6 (C-25), 102.1 (C-6), 98.2 (C-6), 45.7 (C-21), 42.5 (C-16), 41.7 (C-9), 39.8 (C-13), 39.5 (C-12), 19.1 (C-4), 17.1 (C-22), 13.7 (C-23)

F_p: 183 °C

IR: 3379, 3291, 3085, 2928, 1729, 1683, 1649, 1582, 1557, 1492, 1439, 1394, 1394, 1282, 1267, 1143, 1109, 1090, 858 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 650.2134$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 650.2112

2,2'-((7,11,18,21-Tetraoxa-3,15-diazatrispiro[5.2.2.5¹².2⁹.2⁶]henicosan-3,15-diyl)bis(2-oxoethan-2,1-diyl))bis(8-methyl-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-6-on) (67)



Variante 1: 9 (100 mg, 291.26 μmol) wurde in trockenem Et_2O (40 mL) suspendiert und auf 0°C abgekühlt. NaH (60% in Mineralöl, 13 mg, 320.39 μmol , 1.1 eq.) und TMSCl (41 μL , 320.39 μmol , 1.1 eq.) wurden zugegeben und 1h gerührt. **65** (63 mg, 291.26 μmol , 1.0 eq.) und TMSOTf (1 Tropfen) wurden zugegeben und 24h bei RT gerührt. Die entstandene weiße Suspension wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **67** (45 mg, 57.19 μmol , 39%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.26$

¹H NMR (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 6.91 (s, 2H, H-6), 6.77 (s, 2H, H-6), 6.71 (t, $^3J=4.7$ Hz, 2H, H-8), 6.13 (s, 2H, H-2), 3.86 – 3.76 (m, 4H, H-14), 3.76 - 3.58 (m, 8H, H-14, H-11), 3.53 – 3.36 (m, 4H, H-11), 3.04 (d, $^3J=4.7$ Hz, 4H, H-9), 2.34 (s, 6H, H-4), 1.96 - 1.74 (m, 8H, H-12)

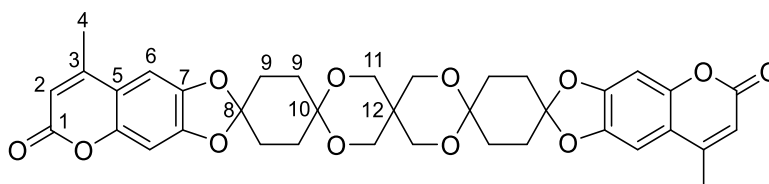
¹³C NMR (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 165.4 (C-10), 161.1 (C-1), 152.3 (C-3), 150.6 (C-7), 150.5 (C-5), 144.6 (C-7), 113.8 (C-5), 112.2 (C-2), 110.9 (C-6), 102.1 (C-8), 98.3 (C-6), 96.8 (C-13), 63.4 (C-14), 63.3 (C-14), 38.5 (C-9), 38.4 (C-9), 33.8 (C-11), 33.6 (C-11), 33.2 (C-15), 31.0 (C-12), 30.9 (C-12), 19.0 (C-4)

F_p: Zersetzung ab 240°C , **T_g:** 135°C

IR: 3484, 3469, 2955, 2932, 2867, 2747, 2659, 1729, 1637, 1582, 1492, 1448, 1384, 1345, 1263, 1221, 1203, 1141, 1090, 1045, 962, 940, 920, 888, 863, 806, 744, 729, 711, 650 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 786.2648$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 786.2636

8,8''''-Dimethyl-6H,6''''H-pentaspiro[[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]dioxan-5'',5''''-[1,3]dioxan-2''',1''''-cyclohexan-4''''',2''''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6,6''''-dion (69)



Variante 1: 10 (48 mg, 0.17 mmol) wurde in trockenem Et_2O (8 mL) suspendiert und auf 0°C abgekühlt. NaH (60% in Mineralöl, 9 mg, 0.22 mmol, 1.3 eq.) und TMSCl (28 μL , 0.22 mmol, 1.3 eq.) wur-

den zugegeben und 1h gerührt. **65** (36 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.) und TMSOTf (1 Tropfen) wurden zugegeben und 24h bei RT gerührt. Die entstandene weiße Suspension wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **69** (47 mg, 0.07 mmol, 83%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 50:1 $R_f = 0.26$; DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.47$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, DMSO- d_6): 7.22 (s, 2H, H-6), 7.02 (s, 2H, H-6), 6.20 (s, 2H, H-2), 3.80 - 3.64 (m, 8H, H-11), 2.34 (s, 6H, H-4), 1.74 - 1.56 (m, 8H, H-9), 1.51 - 1.28 (m, 8H, H-9)

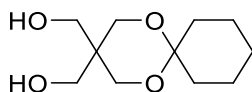
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, DMSO- d_6): 160.4 (C-1), 153.9 (C-3), 150.3 (C-5), 150.0 (C-7), 144.2 (C-7), 120.2 (C-8), 113.4 (C-5), 111.2 (C-2), 103.1 (C-6), 98.0 (C-6), 96.5 (C-10), 62.9 (C-11), 62.1 (C-11), 39.5 (C-9), 32.2 (C-9), 31.0 (C-9), 28.6 (C-9), 27.1 (C-12), 18.8 (C-4)

F_p : Zersetzung ab 220 °C

IR: 3057, 2962, 2925, 2858, 2800, 2364, 1621, 1584, 1493, 1441, 1398, 1377, 1342, 1270, 1223, 1207, 1159, 1139, 1088, 1043, 993, 970, 944, 909, 865, 807, 774, 735, 705, 690 cm^{-1}

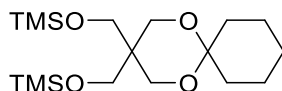
MS: (EI) $m/z = 672.2211$ [M] $^+$, berechnet: 672.2207

(1,5-Dioxaspiro[5.5]undecan-3,3-diyl)dimethanol (65b)^[63,197]

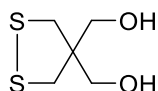


Cyclohexanon (5.0 g, 50.95 mmol), Pentaerythrit (10.4 g, 76.42 mmol, 1.50 eq.) und $p\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (484.5 mg, 2.55 mmol, 0.05 eq.) wurden in Benzol (100 mL) suspendiert und für 2 h am Wasserabscheider erhitzt. Die organische Lösung wurde mit NaHCO_3 gewaschen und die wässrige Phase wurde dreimal mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 10:1) gereinigt. Man erhielt **65b** (7.2 g, 33.38 mmol, 65%) als einen weißen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

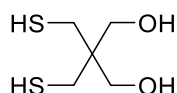
(((1,5-Dioxaspiro[5.5]undecan-3,3-diyl)bis(methylen))bis(oxy))bis(trimethylsilylan) (65a)



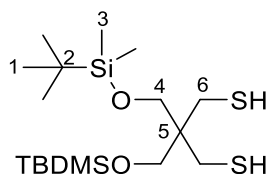
Das Diol **65b** (3.0 g, 13.87 mmol) wurde in trockenem Toluol (75 mL) suspendiert und es wurden getrocknetes NEt_3 (9.6 mL, 69.36 mmol, 5.0 eq.) und TMSCl (8.8 mL, 69.36 mmol, 5.0 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite[®] abfiltriert, mit PE gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in PE suspendiert und nochmals über Celite[®] abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **65a** (5.0 g, 13.95 mmol, quant.) als einen weißen Feststoff.

(1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol (73)^[60]

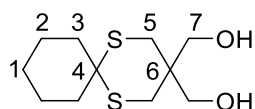
Na₂S (60%, 4.97 g, 38.18 mmol, 1.00 eq.) und Schwefel (2.45 g, 9.54 mmol, 0.25 eq.) wurden in trockenem DMF (100 mL) vorgelegt und für 3 h bei 100 °C gerührt. 2,2-Bis(brommethyl)propan-1,3-diol **72** (10.00 g, 38.18 mmol, 1.00 eq.) wurde zugegeben und die Suspension wurde für 2 Tage bei 110 °C gerührt. Das Gemisch wurde auf ein Eis-Wasser-Gemisch (400 mL) gegossen und die wässrige Phase dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und im Hochvakuum (10⁻³ mbar) entfernt. **73** wurde ohne weitere Reinigung weiter verwendet.

2,2-Bis(mercaptomethyl)propan-1,3-diol (74)^[7]

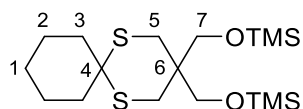
LiAlH₄ (3.19 g, 84.03 mmol, 2.2 eq.) wurde in trockenem THF (25 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. **73** (6.35 g, 38.19 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem THF (25 mL) langsam dazu getropft. Nach vollendeter Zugabe wurde 3 h bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlen wurde mit H₂O hydrolysiert, die wässrige Phase mit DCM extrahiert und dann mit 1N HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **74** (3.87 g, 23.00 mmol, 60%) als einen weißen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

2,2-Bis(((tert)-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)propan-1,3-dithiol (75)^[60]

74 (2.9 g, 17.23 mmol), TBDMSCl (5.97 g, 39.64 mmol, 2.3 eq.) und Imidazol (3.52 g, 51.70 mmol, 3.0 eq.) wurden in trockenem DCM (70 mL) gelöst und 2 h bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite® abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit Hexan aufgenommen, über Celite® filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **75** (7.16 g, 18.05 mmol, quant.) als farbloses Öl. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein. DC: Hexan R_f = 0.3

(1,5-Dithiaspiro[5.5]undecan-3,3-diyl)dimethanol (2)^[60]

75 (1.0 g, 2.25 mmol) und Cyclohexanon (0.27 g, 2.77 mmol, 1.10 eq.) wurden in CHCl_3 (25 mL) gelöst. Iod (95.8 mg, 0.38 mmol, 0.15 eq.) wurde zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. HF (48%, mg, mmol, eq.) wurde zugegeben und es wurde weitere 2 h gerührt. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde abfiltriert mit wenig DCM nachgewaschen. Der Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Man erhielt **2** (498.0 mg, 1.97 mmol, 78%) als einen weißen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

((1,5-Dithiaspiro[5.5]undecan-3,3-diyl)bis(methylen))bis(oxy))bis(trimethylsilan) (76)

2 (210 mg, 0.85 mmol) wurde in trockenem Toluol (30 mL) suspendiert und es wurden vorsichtig getrocknetes NEt_3 (586 μL , 4.23 mmol, 5.0 eq.) und TMSCl (536 μL , 4.23 mmol, 5.0 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite® abfiltriert, mit PE gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in PE suspendiert und nochmals über Celite® abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **76** (333 mg, 0.85 mmol, 100%) als einen weißen Feststoff.

DC: PE $R_f = 0.48$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, C_6D_6): 3.72 (s, 4H, H-7), 2.67 (s, 4H, H-5), 2.06 - 1.89 (m, 4H, H-3), 1.65 - 1.49 (m, 4H, H-2), 1.32 - 1.19 (m, 2H, H-1), 0.12 (s, 18H, TMS)

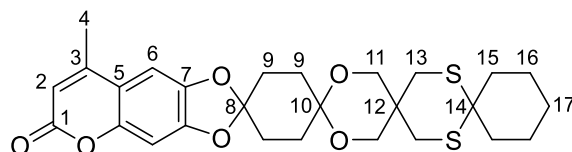
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, C_6D_6): 64.0 (C-7), 52.3 (C-4), 38.9 (C-3), 37.1 (C-6), 29.9 (C-5), 26.5 (C-1), 23.1 (C-2), 0.0 (TMS)

F_p: 70-72 °C

IR: 2956, 2935, 2925, 2911, 2901, 2861, 2851, 1463, 1440, 1408, 1322, 1250, 1128, 1111, 1065, 1011, 876, 862, 833, 754, 746, 733, 687 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 392.1689$ [M]⁺, berechnet: 392.1695 $\text{C}_{17}\text{H}_{36}\text{O}_2\text{Si}_2$

8'''-Methyl-6''''H-tetraspiro[cyclohexan-1,2'-[1,3]dithian-5',5''-[1,3]dioxan-2'',1'''-cyclohexan-4''',2''''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6''''-on (78)



Das Keton **19** (53 mg, 0.18 mmol) wurde in getrocknetem Et₂O (30 mL) und DCM (5 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. NaH (60% in Mineralöl, 9 mg, 0.22 mmol, 1.2 eq.) und TMSCl (28 µL, 0.22 mmol, 1.2 eq.) wurden zugegeben und 1h gerührt. Der Alkohol **2** (50 mg, 0.20 mmol, 1.1 eq.) und TMSOTf (2 Tropfen) wurden zugegeben und bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM) gereinigt. Man erhielt **78** (70 mg, 0.14 mmol, 74%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 100:1 R_f = 0.67

¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.89 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-6), 6.14 (s, 1H, H-2), 3.98 - 3.78 (m, 4H, H-11), 2.74 (s, 4H, H-13), 2.36 (s, 3H, H-4), 2.15 - 2.02 (m, 8H, H-9), 2.02 - 1.88 (m, 4H, H-15), 1.72 - 1.55 (m, 4H, H-16), 1.55 - 1.38 (m, 2H, H-17)

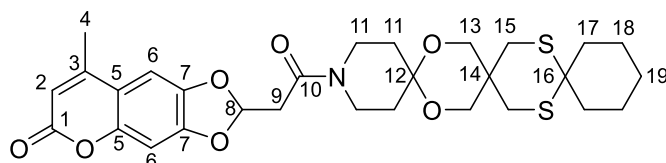
¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 161.4 (C-1), 152.5 (C-3), 150.7 (C-7), 150.4 (C-5), 144.7 (C-7), 120.2 (C-8), 113.4 (C-5), 111.8 (C-2), 102.0 (C-6), 98.3 (C-6), 97.1 (C-10), 66.6 (C-11), 66.5 (C-11), 51.7 (C-14), 37.6 (C-15), 37.5 (C-15), 31.2 (C-13), 31.0 (C-9), 29.1 (C-3), 28.6 (C-9), 25.8 (C-17), 22.2 (C-16), 19.1 (C-4)

F_p: Zersetzung ab 230 °C

IR: 3525, 3505, 3485, 3415, 2931, 1723, 1624, 1580, 1499, 1449, 1401, 1376, 1344, 1301, 1272, 1235, 1220, 1204, 1139, 1123, 1109, 1085, 996, 954, 942, 921, 907, 850, 834, 768 cm⁻¹

MS: (ESI) m/z = 517.1703 [M+H]⁺, berechnet: 517.1713 C₂₇H₃₃O₆S₂

8-Methyl-2-(2-oxo-2-(7,21-dioxa-11,18-dithia-3-azatrispiro[5.2.2.5¹².2⁹.2⁶]henicosan-3-yl)ethyl)-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-6-on (77)



Das Keton **12** (92 mg, 0.27 mmol) wurde in getrocknetem Et₂O (20 mL) und DCM (2 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. NaH (60% in Mineralöl, 13 mg, 0.32 mmol, 1.2 eq.) und TMSCl (41 µL, 0.32 mmol, 1.2 eq.) wurden zugegeben und 1h gerührt. Der Alkohol **2** (70 mg, 0.28 mmol, 1.1 eq.) und TMSOTf (2 Tropfen) wurden zugegeben und bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschicht-

chromatographie, gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM) gereinigt. Man erhielt **77** (85 mg, 0.15 mmol, 55%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.33$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 6.93 (s, 1H, H-6), 6.80 (s, 1H, H-6), 6.73 (t, $^3J=5.0$ Hz, 1H, H-8), 6.15 (s, 1H, H-2), 3.94 - 3.78 (m, 4H, H-13), 3.67 (t, $^3J=5.4$ Hz, 2H, H-11), 3.52 - 3.40 (m, 2H, H-11), 3.05 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-9), 2.77 (s, 2H, H-15), 2.66 (s, 2H, H-15), 2.35 (s, 3H, H-4), 1.99 - 1.76 (m, 8H, H-11, H-17), 1.68 - 1.54 (m, 4H, H-18), 1.51 - 1.38 (m, 2H, H-19)

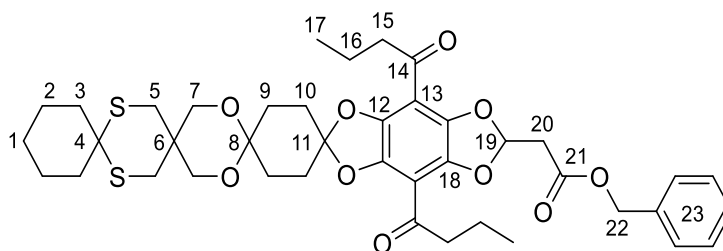
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 165.4 (C-10), 161.1 (C-1), 152.4 (C-3), 150.6 (C-7), 150.5 (C-5), 144.6 (C-7), 113.8 (C-5), 112.2 (C-2), 110.9 (C-8), 102.1 (C-6), 98.4 (C-6), 96.7 (C-12), 66.3 (C-13), 66.2 (C-13), 51.6 (C-16), 42.5 (C-11), 38.5 (C-11), 38.4 (C-9), 37.5 (C-11), 37.5 (C-11), 33.7 (C-17), 30.9 (C-17), 30.9 (C-15), 29.1 (C-14), 25.7 (C-19), 22.2 (C-18), 19.1 (C-4)

F_p : Zersetzung über 230 °C

IR: 3518, 3484, 2930, 2855, 2777, 2751, 1726, 1635, 1583, 1493, 1449, 1405, 1386, 1345, 1298, 1264, 1220, 1204, 1141, 1108, 1081, 1035, 1012, 954, 918, 890, 862, 806, 778, 745 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 573.1851$ [M] $^+$, berechnet: 573.1855 $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_7\text{S}_2$

Benzyl-(4,8-dibutanoyltetraspiro[benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis[1,3]dioxol-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]-dioxan-5'',5'''-[1,3]dithian-2''',1''''-cyclohexan]-6-yl)acetat (80**)**



27 (20 mg, 37.27 μmol) und **76** (22 mg, 55.91 μmol , 1.5 eq.) wurden in trockenem DCM (5 mL) vorgelegt. Es wurde 1 Tropfen TMSOTf hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM \rightarrow DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **80** (22 mg, 28.68 μmol , 78%) als einen orangen Feststoff.

DC: PE/EE 3:1 $R_f = 0.35$; DCM/MeOH 50:1 $R_f = 0.68$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 7.45 - 7.30 (m, 5H, H-23), 6.65 (t, $^3J=5.0$ Hz, 1H, H-19), 5.19 (s, 2H, H-22), 3.95 - 3.79 (m, 4H, H-7), 3.11 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-20), 2.83 (t, $^3J=7.2$ Hz, 4H, H-15), 2.77 - 2.68 (m, 4H, H-5), 2.15 - 2.03 (m, 8H, H-10, H-9), 2.03 - 1.92 (m, 4H, H-3), 1.76 - 1.53 (m, 8H, H-16, H-2), 1.53 - 1.37 (m, 2H, H-1), 0.96 (t, $^3J=7.3$ Hz, 6H, H-17)

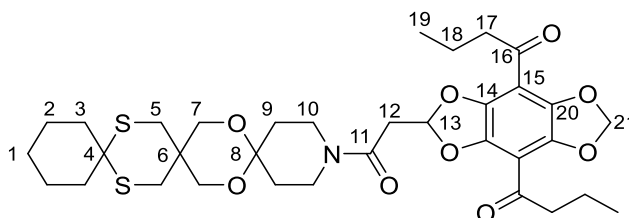
^{13}C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 196.4 (C-14), 168.5 (C-21), 151.8 (C-12), 141.4 (C-18), 128.6 (C-23), 128.2 (C-23), 110.9 (C-13), 109.6 (C-19), 99.6 (C-8), 66.9 (C-7), 66.5 (C-22), 45.6 (C-15), 41.1 (C-20), 37.6 (C-3), 32.2 (C-3), 31.9 (C-3), 31.0 (C-5), 30.9 (C-10), 29.1 (C-9), 25.5 (C-1), 22.2 (C-2), 17.2 (C-16), 13.8 (C-17)

F_p : 161-163 °C

IR: 2960, 2933, 2870, 1739, 1687, 1465, 1442, 1398, 1377, 1299, 1281, 1271, 1246, 1188, 1122, 1110, 1038, 1005, 982, 958, 919, 903, 736, 696 cm^{-1}

MS: (ESI) $m/z = 767.2925$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 767.2924 $\text{C}_{41}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{S}_2$

1,1'-(2-(2-Oxo-2-(7,21-dioxa-11,18-dithia-3-azatri Spiro[5.2.2.5¹².2⁹.2⁶])henicosan-3-yl)ethyl)-benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dioxol)-4,8-diyl)bis(butan-1-on) (79)



26 (27 mg, 60.61 μmol ,) und **76** (36 mg, 90.92 μmol , 1.5 eq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) vorgelegt. Es wurde 1 Tropfen TMSOTf hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM \rightarrow DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **84** (38 mg, 56.23 μmol , 93%) als einen orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.25$

^1H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 6.74 (t, $^3J=4.3$ Hz, 1H, H-13), 6.10 (s, 2H, H-21), 3.86 (br. s., 4H, H-7), 3.72 - 3.61 (m, 2H, H-10), 3.53 - 3.44 (m, 2H, H-10), 3.16 - 3.06 (m, 2H, H-12), 2.88 (t, $^3J=7.2$ Hz, 4H, H-17), 2.79 - 2.61 (m, 4H, H-5), 2.02 - 1.80 (m, 8H, H-9, H-3), 1.76 - 1.56 (m, 8H, H-18, H-2), 1.50 - 1.37 (m, 2H, H-1), 0.97 (t, $^3J=7.4$ Hz, 6H, H-19)

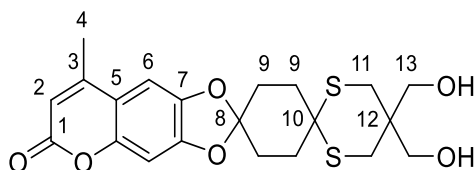
^{13}C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 196.3 (C-16), 165.2 (C-11), 140.9 (C-14), 140.6 (C-20), 111.3 (C-13), 110.0 (C-15), 102.5 (C-21), 96.7 (C-8), 66.2 (C-7), 51.6 (C-4), 45.6 (C-17), 42.6 (C-10), 38.5 (C-), 38.4 (C-12), 37.5 (C-9), 33.5 (C-9), 31.2 (C-9), 30.9 (C-5), 29.1 (C-6), 25.7 (C-1), 22.2 (C-2), 17.1 (C-18), 13.7 (C-19)

F_p : 94-96 °C

IR: 2960, 2931, 2873, 2856, 1684, 1642, 1601, 1474, 1434, 1409, 1363, 1348, 1282, 1241, 1224, 1205, 1188, 1107, 1061, 1039, 1013, 951, 942, 934, 891, 864, 800, 732, 701, 597 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 675.2535$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 675.2536 $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{NO}_9\text{S}_2$

5'',5''-Bis(hydroxymethyl)-8-methyl-6H-dispiro[[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]dithian]-6-on (82)



10 (249 mg, 869.77 μmol), **75** (380 mg, 956.75 μmol , 1.10 eq.) und Iod (29 mg, 113.07 μmol , 0.13 eq.) wurden in trockenem DCM (20 mL) gelöst und bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, gerührt. HF (48%, 63 μL , 1.74 mmol, 2.00 eq.) wurde hinzugegeben und es wurde für weiter 2h gerührt. Die Lösung wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (20%) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **82** (330 mg, 755.95 μmol , 87%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.26$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, Aceton- d_6): 7.13 (s, 1H, H-6), 6.83 (s, 1H, H-6), 6.13 (s, 1H, H-2), 3.89 (s, 4H, H-13), 2.93 - 2.88 (m, 4H, H-11), 2.41 (s, 3H, H-4), 2.35 - 2.22 (m, 4H, H-9), 2.21 - 2.10 (m, 4H, H-9)

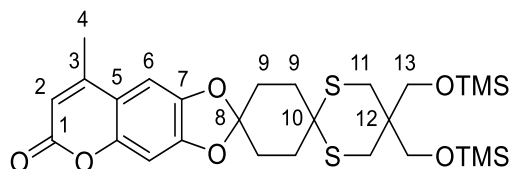
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 163.3 (C-1), 154.9 (C-3), 151.8 (C-7), 151.0 (C-5), 145.7 (C-7), 120.8 (C-8), 114.4 (C-5), 111.8 (C-2), 103.0 (C-6), 98.8 (C-6), 65.0 (C-13), 64.9 (C-13), 49.7 (C-10), 44.6 (C-12), 36.4 (C-9), 35.2 (C-9), 31.9 (C-9), 30.1 (C-11), 19.5 (C-4)

F_p : Zersetzung ab 205 $^\circ\text{C}$

IR: 3710, 2923, 2650, 2585, 2370, 2355, 1715, 1696, 1624, 1583, 1493, 1450, 1401, 1365, 1345, 1304, 1270, 1256, 1208, 1142, 1109, 1086, 1067, 968, 923, 838, 811, 745, 727 cm^{-1}

MS: (ESI) $m/z = 437.1064$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 437.1093 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{S}_2$

8-Methyl-5'',5''-bis(((trimethylsilyl)oxy)methyl)-6H-dispiro[[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]dithian]-6-on (83)



82 (200 mg, 0.46 mmol) wurde in trockenem Toluol (10 mL) suspendiert und es wurden vorsichtig getrocknetes NEt_3 (635 μL , 4.58 mmol, 10.0 eq.) und TMSCl (582 μL , 4.58 mmol, 10.0 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite[®] abfiltriert, mit PE gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rück-

stand wurde in PE suspendiert und nochmals über Celite® abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man **83** (266 g, 0.46 mmol, quant.) als einen weißen Feststoff.

DC: PE/EE 3:1 $R_f = 0.39$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, C_6D_6): 6.55 (s, 1H, H-2), 6.40 (s, 1H, H-2), 5.84 (d, $^4J=1.1$ Hz, 1H, H-2), 3.71 (s, 4H, H-13), 2.63 (s, 4H, H-11), 2.25 - 2.14 (m, 4H, H-9), 2.05 - 1.94 (m, 4H, H-9), 1.50 (d, $^4J=1.1$ Hz, 3H, H-4), 0.16 - 0.10 (m, 18H, TMS)

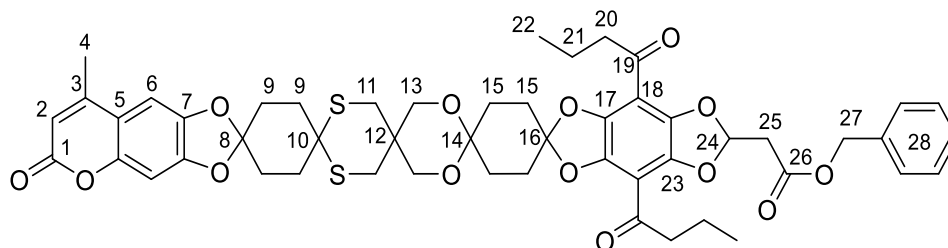
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, C_6D_6): 160.5 (C-1), 151.5 (C-3), 151.5 (C-7), 151.0 (C-5), 144.8 (C-7), 120.0 (C-8), 114.0 (C-5), 113.1 (C-2), 102.7 (C-6), 98.8 (C-6), 63.9 (C-13), 49.7 (C-10), 44.5 (C-12), 36.8 (C-9), 35.3 (C-9), 31.9 (C-9), 30.2 (C-11), 18.7 (C-4), -0.08 (TMS)

F_p: 142-144 °C

IR: 3055, 2956, 2930, 2914, 2858, 1726, 1633, 1620, 1580, 1489, 1439, 1360, 1344, 1225, 1208, 1158, 1135, 1116, 1091, 1065, 1042, 967, 947, 921, 906, 872, 838, 809, 748, 690 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 580.1812$ [M]⁺, berechnet: 580.1805 $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{S}_2\text{Si}_2$

Benzyl-2-(4,8-dibutyryl-8''''-methyl-6''''-oxo-6''''H-pentaspiro[benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]dioxan-5'',5'''-[1,3]dithian-2''',1''''-cyclohexan-4''''',2''''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6-yl)acetat (85**)**



27 (20 mg, 37.27 μmol) und **83** (24 mg, 41.00 μmol , 1.1 eq.) wurden in trockenem DCM (5 mL) vorgelegt. Es wurde 1 Tropfen TMSOTf hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM \rightarrow DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **85** (23 mg, 24.08 μmol , 64%) als einen orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.44$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 600 MHz, CDCl_3): 7.40 - 7.32 (m, 5H, H-28), 6.90 (s, 1H, H-6), 6.77 (s, 1H, H-6), 6.66 (t, $^3J=5.1$ Hz, 1H, H-24), 6.16 (d, $^4J=1.1$ Hz, 1H, H-2), 5.19 (s, 2H, H-27), 3.90 (s, 4H, H-13), 3.11 (d, $^3J=4.9$ Hz, 2H, H-25), 2.85 - 2.82 (m, 4H, H-20), 2.81 - 2.77 (m, 4H, H-11), 2.46 - 2.42 (m, 2H, H-15, H-9), 2.36 (d, $^4J=1.1$ Hz, 3H, H-4), 2.32 - 2.24 (m, 4H, H-15, H-9), 2.19 - 2.04 (m, 10H, H-15, H-9), 1.72 - 1.66 (m, 4H, H-21), 1.00 - 0.93 (m, 6H, H-22)

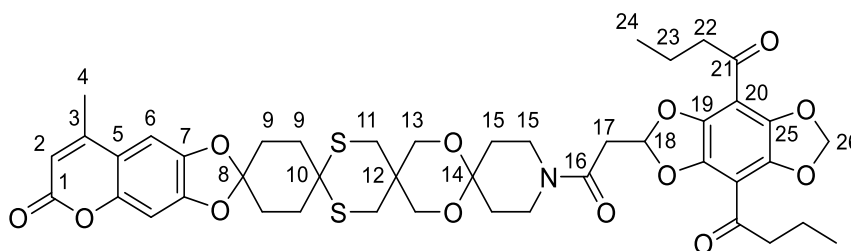
¹³C NMR (δ /ppm, 125 MHz, CDCl₃): 196.4 (C-19), 167.5 (C-26), 161.4 (C-1), 152.5 (C-3), 150.6 (C-5), 150.4 (C-7), 144.5 (C-23), 140.8 (C-7), 139.9 (C-17), 135.2 (C-28), 128.6 (C-28), 128.4 (C-28), 128.2 (C-28), 120.4 (C-8), 119.6 (C-16), 113.5 (C-18), 111.9 (C-5), 110.1 (C-2), 109.6 (C-24), 102.0 (C-6), 98.3 (C-6), 97.2 (C-14), 66.9 (C-13), 66.4 (C-27), 49.3 (C-10), 45.6 (C-20), 40.0 (C-25), 36.9 (C-15, C-9), 34.2 (C-15, C-9), 31.3 (C-15, C-9), 31.2 (C-11), 31.0 (C-12), 29.0 (C-15, C-9), 19.1 (C-4), 17.2 (C-21), 13.8 (C-22)

F_p: 115 °C

IR: 2961, 2931, 2872, 2851, 1725, 1687, 1637, 1627, 1585, 1495, 1440, 1403, 1377, 1348, 1283, 1273, 1259, 1225, 1207, 1140, 1107, 1067, 1043, 1012, 969, 922, 905, 863, 802, 744 cm⁻¹

MS: (ESI) m/z = 955.3015 [M]⁺, berechnet: 955.3033 C₅₁H₅₄O₁₄S₂

1,1'-(2-(2-(8'''-Methyl-6'''-oxo-6'''H-tetraspiro[piperidin-4,2'-[1,3]dioxan-5',5''-[1,3]dithian-2'',1'''-cyclohexan-4''',2''''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen)-1-yl)-2-oxoethyl)benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-4,8-diyl)bis(butan-1-on) (84)



83 (40 mg, 68.86 μ mol) und **26** (34 mg, 75.74 μ mol, 1.1 eq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) vorgelegt. Es wurde 1 Tropfen TMSOTf hinzugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM \rightarrow DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **84** (30 mg, 34.72 μ mol, 50%) als einen orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 R_f = 0.4

¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.89 (s, 1H, H-6), 6.82 - 6.65 (m, 2H, H-6, H-18), 6.25 - 6.02 (m, 3H, H-2, H-25), 3.97 - 3.80 (m, 4H, H-13), 3.72 - 3.62 (m, 2H, H-15), 3.54 - 3.41 (m, 2H, H-15), 3.11 (d, ³J=4.1 Hz, 2H, H-17), 2.88 (t, ³J=7.2 Hz, 4H, H-21), 2.35 (s, 3H, H-4), 2.84 - 2.65 (m, 4H, H-11), 2.30 - 2.19 (m, 4H, H-9), 2.18 - 2.09 (m, 4H, H-9), 1.94 - 1.81 (m, 4H, H-15), 1.77 - 1.62 (m, 4H, H-22), 0.97 (t, ³J=7.4 Hz, 6H, H-23)

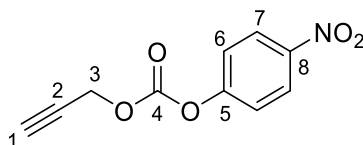
¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 196.4 (C-21), 165.3 (C-16), 161.3 (C-1), 152.4 (C-3), 150.5 (C-5), 150.4 (C-7), 144.5 (C-25), 141.0 (C-7), 140.6 (C-19), 119.6 (C-8), 113.5 (C-20), 111.9 (C-2), 111.3 (C-18), 110.0 (C-5), 102.5 (C-26), 102.0 (C-6), 98.3 (C-6), 96.9 (C-14), 66.1 (C-13), 49.2 (C-12), 45.6 (C-22), 42.6 (C-15), 38.5 (C-15), 38.4 (C-17), 34.1 (C-9), 33.6 (C-15), 31.3 (C-9, C-15), 31.2 (C-11), 29.1 (C-12), 19.1 (C-4), 17.1 (C-23), 13.7 (C-24)

F_p: 113 °C

IR: 3423, 3364, 3064, 2961, 2933, 2874, 2251, 1718, 1686, 1639, 1584, 1495, 1474, 1451, 1436, 1403, 1368, 1347, 1282, 1273, 1259, 1242, 1224, 1141, 1108, 1067, 1045, 925, 906, 863, 812, 773, 731, 647, 596, 496 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 863.2668$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 863.2645 $\text{C}_{44}\text{H}_{49}\text{NO}_{13}\text{S}_2$

4-Nitrophenyl-prop-2-ynyl-carbonat (95)^[198]



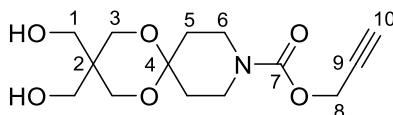
Propargylalkohol (412 μL , 7.13 mmol, 1.5 eq.) wurde in trockenem DCM (15 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, woraufhin Chlorameisensäure-4-nitrophenylester **94** (959 mg 4.76 mmol, 1.0 eq.) und trockenes Pyridin (960 μL , 11.89 mmol, 2.5 eq.) tropfenweise zugegeben wurden. Es wurde bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, gerührt. Es wurde 1M HCl zugegeben und zweimal mit DCM gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie gereinigt (Hex:EE 50:1). Man erhielt **95** (856 mg, 81%) als einen farblosen, kristallinen Feststoff.

DC: Hex:EE 6:1 $R_f = 0.4$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3 , H-): 8.26 - 8.33 (m, 2H, H-7), 7.38 - 7.45 (m, 2H, H-6), 4.89 (d, $^3J=2.5$ Hz, 2H, H-3), 2.63 (t, $^3J=2.5$ Hz, 1H, H-1)

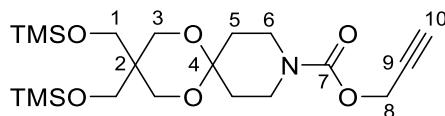
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3 , H-): 155.2 (C-5), 151.9 (C-4), 145.5 (C-8), 125.3 (C-7), 121.7 (C-6), 76.7 (C-2), 76.0 (C-1), 56.4 (C-3)

Prop-2-yn-1-yl 3,3-bis(hydroxymethyl)-1,5-dioxo-9-azaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (96)^[46]



93^[52] (3.66 g, 10.42 mmol) und Pd/C (123 mg, 1.04 mmol, 0.1 eq.) wurden in trockenem THF (400 mL) vorgelegt. Die Suspension wurde unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, wurde der Aktivester **95** (2.30 g, 10.40 mmol, 1 eq.) zugegeben und die Suspension über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde über Celite® abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 25:1) gereinigt. Man erhielt **96** (2.06 g, 6.88 mmol, 66%) als weißen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

Prop-2-yn-1-yl-3,3-bis(((trimethylsilyl)oxy)methyl)-1,5-dioxaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (97)



96 (50 mg, 0.17 mmol) wurde in trockenem Toluol (10 mL) suspendiert und es wurden getrocknetes NEt_3 (140 μL , 1.00 mmol, 6.0 eq.) und TMSCl (127 μL , 1.00 mmol, 6.0 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite® abfiltriert, mit PE gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in PE suspendiert und nochmals über Celite® abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde nochmals am Rotationsverdampfer entfernt und man erhielt **97** (74 mg, 0.17 mmol, quant.) als einen weißen Feststoff.

DC: PE/EE 3:1 $R_f = 0.64$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, C_6D_6): 4.59 (d, $^4J=2.4$ Hz, 2H, H-8), 3.62 (s, 4H, H-1), 3.59 - 3.44 (m, 6H, H-3, H-6), 3.43 - 3.28 (m, 2H, H-6), 1.98 (t, $^4J=2.4$ Hz, 1H, H-10), 1.71 - 1.58 (m, 4H, H-5), 0.09 (s, 18H, TMS)

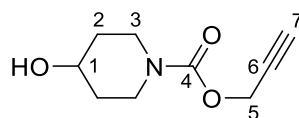
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, C_6D_6): 154.6 (C-7), 96.8 (C-4), 79.6 (9), 74.9 (C-10), 62.3 (C-3), 62.2 (C-1), 53.2 (C-8), 41.4 (C-5), 41.4 (C-2), 40.4 (C-6), -0.2 (TMS)

F_p : 51-52 °C

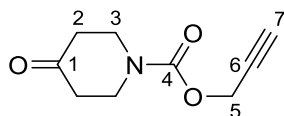
IR: 3309, 2957, 2894, 1716, 1456, 1434, 1416, 1365, 1351, 1341, 1287, 1273, 1240, 1190, 1166, 1133, 1113, 1092, 1072, 1053, 1032, 1016, 1010, 982, 914, 897, 867, 835, 804, 784, 768, 667, 618 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 443.2157$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 443.2159 $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_6\text{Si}_2$

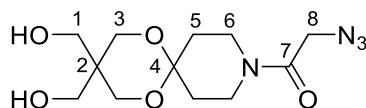
Prop-2-yn-1-yl 4-hydroxypiperidin-1-carboxylat (103)^[158]



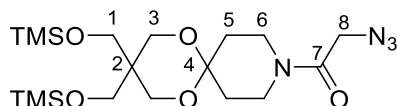
4-Hydroxypiperidin **102** (1.37 g, 13.56 mmol) wurde in trockenem DCM (250 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. **95** (3.00 g, 13.56 mmol, 1 eq.) wurde zugegeben und das Gemisch wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bis kurz vor der Trockene entfernt und das ausgefallene para-Nitrophenol wurde über Celite® abfiltriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **103** (2.13 g, 11.63 mmol, 86%) als farblose Flüssigkeit. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

Prop-2-yn-1-yl 4-oxopiperidin-1-carboxylat (98)^[158]

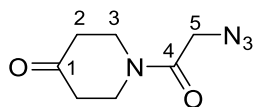
103 (2.13 g, 11.63 mmol) wurde in trockenem DCM (250 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. DESS-MARTIN-Periodinan (6.41 g, 15.11 mmol, 1.3 eq.) wurde portionsweise zugegeben und es wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde dreimal mit gesättigter NaHCO₃/Na₂S₂O₃-Lösung (250 g/L) und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **98** (1.58 g, 8.72 mmol, 75%) als beigen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

2-Azido-1-(3,3-bis(hydroxymethyl)-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecan-9-yl)ethan-1-on (87)^[42]

86^[66] (1.00 g, 3.40 mmol) wurde in trockenem DMF (30 mL) gelöst. NaN₃ (0.24 g, 3.74 mmol, 1.1 eq.) wurde zugegeben und es wurde 4 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Feinvakuum (1·10⁻³ mbar) entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM:MeOH 25:1) gereinigt. Man erhielt **87** (0.96 g, 3.20 mmol, 94%) als einen weißen Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

2-Azido-1-(3,3-bis(((trimethylsilyl)oxy)methyl)-1,5-dioxa-9-azaspiro[5.5]undecan-9-yl)ethan-1-on (88)^[199]

Das Diol **87** (0.50 g, 1.66 mmol) wurde in trockenem Toluol (50 mL) suspendiert und es wurden getrocknetes NEt₃ (1.2 mL, 8.32 mmol, 5.0 eq.) und TMSCl (1.1 mL, 8.32 mmol, 5.0 eq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite® abfiltriert, mit PE gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in PE suspendiert und nochmals über Celite® abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **88** (0.72 g, 1.62 mmol, 97%) als einen weißen Feststoff.

1-(2-Azidoacetyl)piperidin-4-on (90)^[138]

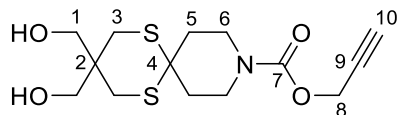
89^[42] (1.55 g, 8.81 mmol) wurde in trockenem DMF (15 mL) gelöst. NaN₃ (0.86 g, 13.21 mmol, 1.5 eq.) wurde zugegeben und 4 h bei RT gerührt. Weinsäurelösung (20%) wurde zugegeben und das Gemisch dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **90** (1.6 g, 8.78 mmol, quant.) als ein hellbraunes Öl.

DC: DCM/MeOH 25:1 R_f = 0.42

¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 3.98 (s, 2H, H-5) 3.89 - 3.84 (m, 2H, H-3), 3.63-3.67 (m, 2H, 3) , 2.44 - 2.49 (m, 4H, H-2)

¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 205.8 (C-1), 165.9 (C-4), 50.5 (C-5), 43.3 (C-3), 41.0 (C-3), 40.7 (C-2), 40.3 (C-2)

MS: (EI) m/z = 182.0803 [M]⁺, berechnet: 182.0810 C₇H₁₀N₄O₂

Prop-2-yn-1-yl-3,3-bis(hydroxymethyl)-1,5-dithia-9-azaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (99)

98 (200 mg, 1.1 mmol) und **75** (526 mg, 1.32, 1.2 eq.) wurden in trockenem Toluol (20 mL) gelöst. Eine kleine Kugel Iod wurde zugegeben und es wurde bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und 10 mL DCM sowie HF (48%, 140 µL, 3.92 mmol, 6.0 eq.) wurden zugegeben und es wurde für weiter 2 h gerührt. Die Lösung wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und Na₂S₂O₃-Lösung (20%) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1 → DCM/MeOH 25:1) gereinigt. Man erhielt **99** (317 mg, 0.9 mmol, 87%) als einen weißen Feststoff.

DC: PE/EE 3:1 R_f = 0.19

¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, MeOD): 4.69 (d, ³J=2.3 Hz, 2H, H-8), 3.70 (s, 4H, H-1), 3.59 (s, 4H, H-6), 2.93 (s, 1H, H-10), 2.71 (s, 4H, H-3), 2.11 - 1.94 (m, 4H, H-5)

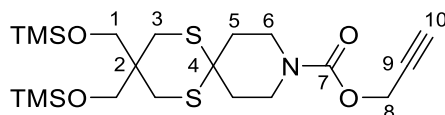
¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, MeOD): 156.7 (C-7), 79.7 (C-9), 76.2 (C-10), 65.0 (C-1), 64.9 (C-1), 54.2 (C-8), 43.4 (C-6), 43.3 (C-6), 41.7 (C-2), 36.8 (C-4), 35.8 (C-5), 30.0 (C-3)

F_p: 149-151 °C

IR: 3291, 3242, 2922, 2872, 2438, 1695, 1464, 1428, 1377, 1362, 1335, 1315, 1277, 1245, 1229, 1198, 1117, 1064, 1031, 1015, 963, 917, 857, 840, 762, 679 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 331.0917$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 331.0912 $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}_2$

Prop-2-yn-1-yl-3,3-bis(((trimethylsilyl)oxy)methyl)-1,5-dithia-9-azaspiro[5.5]undecan-9-carboxylat (100)



99 (200 mg, 0.6 mmol) wurde in trockenem Toluol (200 mL) suspendiert und es wurden getrocknetes NEt_3 (0.67 mL, 4.83 mmol, 8.0 eq.) und TMSCl (0.61 mL, 4.83 mmol, 8.0 eq.) zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde über Celite® abfiltriert, mit PE gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in PE suspendiert und nochmals über Celite® abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde nochmals am Rotationsverdampfer entfernt und man erhielt **100** (279 mg, 0.59 mmol, 97%) als farbloses Öl.

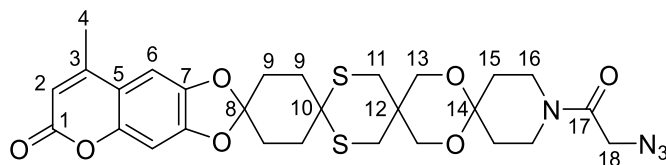
$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, C_6D_6): 4.57 (d, $^3J=2.1$ Hz, 2H, H-8), 3.70 - 3.58 (m, 4H, H-1), 3.54 (br. s., 2H, H-6), 3.39 - 3.27 (m, 2H, H-6), 2.76 (s, 1H, H-10), 2.51 (s, 4H, H-3), 1.75 (br. s., 4H, H-5), 0.11 (s, 18H, TMS)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, C_6D_6): 154.2 (C-7), 74.8 (C-9), 71.7 (C-10), 63.7 (C-1), 53.0 (C-8), 44.3 (C-2), 40.8 (C-6), 37.4 (C-5), 36.6 (C-4), 29.4 (C-3), -0.3 (TMS)

IR: 3310, 2955, 2909, 2864, 1706, 1467, 1432, 1379, 1358, 1340, 1320, 1278, 1262, 1250, 1228, 1201, 1108, 1075, 1017, 968, 918, 872, 836, 783, 747, 685, 625 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 475.1713$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 475.1703 $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}_2\text{Si}_2$

1-(2-Azidoacetyl)-8''''-methyl-6''''H-tetraspiro[piperidin-4,2'-[1,3]dioxan-5',5''-[1,3]dithian-2'',1'''-cyclohexan-4''',2''''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6''''-on (92)



83 (20 mg, 34 μmol) und **90** (7 mg, 38 μmol , 1.1 eq.) wurden in trockenem DCM (7 mL) gelöst. Es wurde ein Tropfen TMSOTf zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 200:1 -> 25:1) gereinigt. Man erhielt **92** (18 mg, 30 μmol , 87%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 50:1 $R_f = 0.24$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 500 MHz, CDCl_3): 6.91 (s, 1H, H-6), 6.78 (s, 1H, H-), 6.16 (d, $^3J=0.9$ Hz, 1H, H-2), 3.97 (s, 2H, H-18), 3.95 - 3.84 (m, 4H, H-13), 3.76 - 3.60 (m, 2H, H-16), 3.47 - 3.36 (m, 2H, H-16), 2.85 (d, $^3J=6.6$ Hz, 2H, H-11), 2.74 (d, $^3J=6.6$ Hz, 2H, H-11), 2.37 (d, $^3J=0.9$ Hz, 3H, H-4), 2.33 - 2.24 (m, 4H, H-9), 2.23 - 2.09 (m, 4H, H-9), 1.95 - 1.85 (m, 4H, H-15)

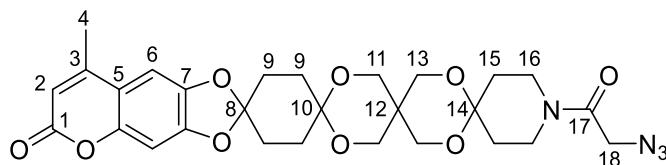
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 126 MHz, CDCl_3): 165.4 (C-17), 161.3 (C-1), 152.4 (C-3), 150.6 (C-5), 150.5 (C-7), 144.5 (C-5), 119.6 (C-8), 113.5 (C-5), 112.0 (C-2), 102.1 (C-6), 98.4 (C-6), 96.8 (C-14), 66.2 (C-13), 50.8 (C-18), 49.3 (C-10), 41.9 (C-16), 39.0 (C-16), 34.2 (C-9, C-15), 33.8 (C-9, C-15), 33.6 (C-9, C-15), 31.4 (C-9, C-15), 31.2 (C-11), 29.2 (C-12), 19.1 (C-4)

F_p : Zersetzung ab 200 °C

IR: 3652, 3416, 3355, 3298, 3204, 2956, 2926, 2856, 2356, 2289, **2108**, 1713, 1581, 1494, 1448, 1401, 1345, 1271, 1252, 1224, 1206, 1139, 1107, 1078, 1044, 966, 952, 926, 902, 861 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 600.1721$ [M]⁺, berechnet: 600.1712 $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$

1-(2-Azidoacetyl)-8''''-methyl-6''''H-tetraspiro[piperidin-4,2'-[1,3]dioxan-5',5''-[1,3]dioxan-2'',1'''-cyclohexan-4''',2''''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6''''-on (91)



19 (20 mg, 0.07 mmol) und **88** (31 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) wurden in trockenem DCM (7 mL) gelöst. Es wurde ein Tropfen TMSOTf zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 200:1 -> 25:1) gereinigt. Man erhielt **91** (16 mg, 0.03 mmol, 40%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.23$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 500 MHz, CDCl_3): 6.89 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-6), 6.14 (d, $^3J=1.3$ Hz, 1H, H-2), 3.95 (s, 2H, H-18), 3.85 - 3.82 (m, 1H, H-11, H-13), 3.78 (s, 4H, H-11, H-13), 3.74 - 3.72 (m, 1H, H-11, H-13), 3.66 (t, $^3J=5.7$ Hz, 2H, H-16), 3.39 (t, $^3J=5.7$ Hz, 2H, H-16), 2.35 (d, $^3J=0.9$ Hz, 3H, H-4), 2.08 - 2.03 (m, 8H, H-9), 1.93 - 1.83 (m, 4H, H-15)

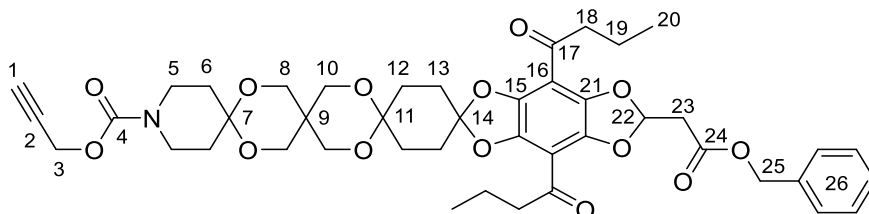
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 126 MHz, CDCl_3): 165.4 (C-17), 161.4 (C-1), 152.5 (C-3), 150.7 (C-7), 150.4 (C-5), 144.7 (C-7), 120.0 (C-8), 113.5 (C-5), 111.9 (C-2), 102.0 (C-6), 98.3 (C-6), 97.2 (C-10), 96.7 (C-14), 63.7 (C-13), 63.5 (C-11), 50.8 (C-18), 41.9 (C-16), 38.9 (C-16), 33.1 (C-15), 31.2 (C-9, C-15), 30.9 (C-12), 28.6 (C-9), 19.1 (C-4)

F_p : Zersetzung ab 240 °C

IR: 3462, 2961, 2928, 2870, 2103, 1712, 1650, 1582, 1496, 1451, 1446, 1402, 1380, 1367, 1348, 1271, 1258, 1224, 1201, 1167, 1143, 1114, 1089, 1059, 1037, 1000, 943, 925, 910, 884, 685, 552, 495 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 568.2156 [M]^+$, berechnet: 568.2169 $C_{28}H_{32}N_4O_9$

Prop-2-yn-1-yl-6-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-4,8-dibutyryltetraspiro[benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dioxol)-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]dioxan-5'',5'''-[1,3]dioxan-2''',4''''-piperidin]-1''''-carboxylat (105)



27 (50 mg, 0.09 mmol) und **97** (45 mg, 0.10 mmol, 1.1eq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) gelöst. Es wurde ein Tropfen TMSOTf zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **105** (39 mg, 0.05 mmol, 51%) als einen gelben harzigen Feststoff.

DC: PE/EE 1:1 $R_f = 0.45$

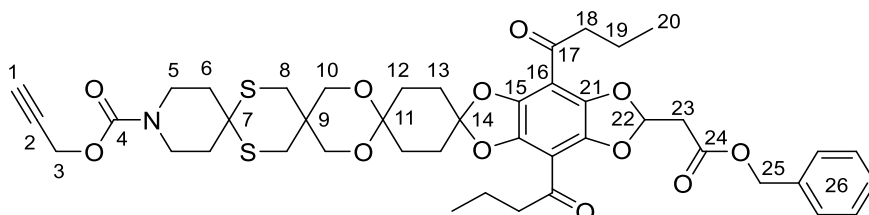
1H NMR (δ /ppm, 300 MHz, $CDCl_3$): 7.35 (s, 5H, H-26), 6.65 (t, $^3J=4.9$ Hz, 1H, H-22), 5.19 (s, 2H, H-25), 4.70 (s, 2H, H-3), 3.77 (br. s., 8H, H-8, H-10), 3.52 (br. s., 4H, H-5), 3.10 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-23), 2.83 (t, $^3J=7.2$ Hz, 4H, H-18), 2.50 - 2.41 (m, 1H, H-1), 2.15 - 2.00 (m, 8H, H-12, H-13), 1.91 - 1.77 (m, 4H, H-6), 1.73 - 1.63 (m, 4H, H-19), 0.96 (t, $^3J=7.3$ Hz, 6H, H-20)

^{13}C NMR (δ /ppm, 75 MHz, $CDCl_3$): 196.3 (C-17), 167.5 (C-24), 154.3 (C-4), 140.8 (C-15), 139.9 (C-21), 135.2 (C-26), 128.6 (C-26), 128.4 (C-26), 128.2 (C-26), 120.4 (C-16), 110.1 (C-14), 109.6 (C-22), 97.1 (C-11), 96.9 (C-7), 74.4 (C-1), 66.9 (C-25), 63.7 (C-8), 63.4 (C-10), 53.0 (C-3), 45.6 (C-18), 40.8 (C-5, C-6), 40.0 (C-23), 33.1 (C-9), 31.0 (C-13, C-12), 28.7 (C-13, C-12), 17.2 (C-19), 13.8 (C-20)

IR: 3263, 2963, 2938, 2873, 1737, 1688, 1471, 1438, 1379, 1358, 1281, 1232, 1200, 1168, 1138, 1118, 1093, 1039, 1005, 944, 919, 895, 761, 733, 698 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 817.3315 [M]^+$, berechnet: 817.3310 $C_{44}H_{51}O_{14}N_1$

Prop-2-yn-1-yl-6-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-4,8-dibutyryltetraspiro[benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]-dioxol)-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]dioxan-5'',5'''-[1,3]dithian-2''',4''''-piperidin]-1''''-carboxylat (104)



27 (50 mg, 0.09 mmol) und **100** (48 mg, 0.10 mmol, 1.1 eq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) gelöst. Es wurde ein Tropfen TMSOTf zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel

wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **104** (61 mg, 0.07 mmol, 77%) als einen gelben harzigen Feststoff.

DC: PE/EE 2:1 $R_f = 0.13$

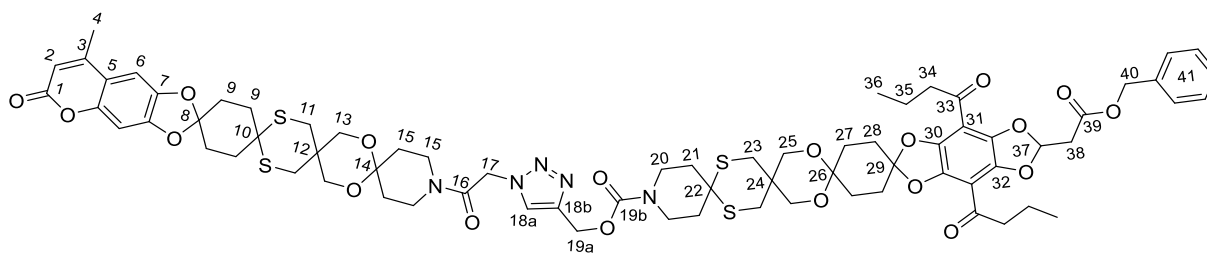
$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 7.40 – 7.30 (m, 5H, H-26), 6.70 - 6.60 (m, 1H, H-22), 5.19 (s, 2H, H-25), 4.70 (br. s., 2H, H-25), 3.88 (br. s., 4H, H-10), 3.62 (br. s., 4H, H-5), 3.20 - 2.99 (m, 2H, H-23), 2.89 - 2.67 (m, 8H, H-18, H-8), 2.48 (d, $^3J=2.1$ Hz, 1H, H-1), 2.13 - 1.96 (m, 12H, H-12, H-13, H-6), 1.79 - 1.55 (m, 4H, H-19), 1.02 - 0.89 (m, 6H, H-20)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 196.3 (C-17), 167.4 (C-24), 154.2 (C-4), 140.8 (C-15), 139.8 (C-21), 135.2 (C-26), 128.6 (C-26), 128.4 (C-26), 128.2 (C-26), 120.4 (C-16), 110.0 (C-14), 109.6 (C-22), 97.2 (C-11), 74.5 (C-1), 66.9 (C-10, C-25), 53.0 (C-23), 49.2 (C-7), 45.6 (C-18), 40.3 (C-5), 40.0 (C-23), 36.9 (C-6), 31.0 (C-12, C-13), 30.8 (C-8), 29.0 (C-9), 28.6 (C-8), 17.2 (C-19), 13.8 (C-20)

IR: 3265, 2961, 2936, 2873, 1739, 1699, 1497, 1468, 1438, 1379, 1357, 1281, 1230, 1206, 1174, 1157, 1109, 1079, 1069, 1037, 1015, 982, 919, 905, 760, 752, 698 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 849.2892$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 849.2853 $\text{C}_{44}\text{H}_{51}\text{O}_{12}\text{N}_1\text{S}_2$

(1-(2-(8'''-Methyl-6'''-oxo-6'''H-tetraspiro[piperidin-4,2'-[1,3]dioxan-5',5''-[1,3]dithian-2'',1'''-cyclohexan-4''',2''''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen)-1-yl)-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 6-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-4,8-dibutyryltetraspiro[benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]dioxan-5'',5'''-[1,3]dithian-2''',4''''-piperidin)-1''''-carboxylat (106)



Das Alkin **104** (33 mg, 0.04 mmol) und das Azid **92** (23 mg, 0.04 mmol, 1.00 eq.) wurden in DCM/MeOH (1:1, 1 mL) gelöst. Cu/C (3wt%, 48 mg, 0.02 mmol, 0.50 eq.) und trockenes NEt_3 (6 μL , 0.04 mmol, 1.05 eq.) wurden zugegeben und die Suspension wurde für 48 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1 -> 25:1) gereinigt. Man erhielt **106** (22 mg, 0.02 mmol, 40%) als orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.32$

¹H NMR (δ /ppm, 500 MHz, CDCl₃): 7.81 (s, 1H, H-18), 7.40 - 7.30 (m, 5H, H-41), 6.89 (s, 1H, H-6), 6.77 (s, 1H, H-6), 6.65 (t, ³J=5.0 Hz, 1H, H-37), 6.15 (d, ⁴J=0.9Hz, 1H, H-2), 5.24 (s, 4H, H-17, H-19), 5.19 (s, 2H, H-40), 3.91 – 3.84 (m, 8H, H-13, H-25), 3.69 - 3.62 (m, 6H, H-15, H-20), 3.62 - 3.54 (m, 6H, H-15, H-20), 3.10 (d, ³J=5.0 Hz, 2H, H-38), 2.99 - 2.94 (m, 4H, H-11), 2.82 (t, ³J=7.3 Hz, 4H, H-34), 2.78 - 2.71 (m, 4H, H-23), 2.36 (d, ⁴J=1.0 Hz, 3H, H-4), 2.30 - 2.22 (m, 4H, H-27, H-28), 2.21 - 2.11 (m, 4H, H-27, H-28), 2.11 - 2.03 (m, 8H, H-9), 2.03 - 1.94 (m, 4H, H-9, H-21), 1.93 - 1.84 (m, 4H, H-9, H-21), 1.73 - 1.65 (m, 4H, H-35), 0.98 – 0.93 (m, 6H, H-36)

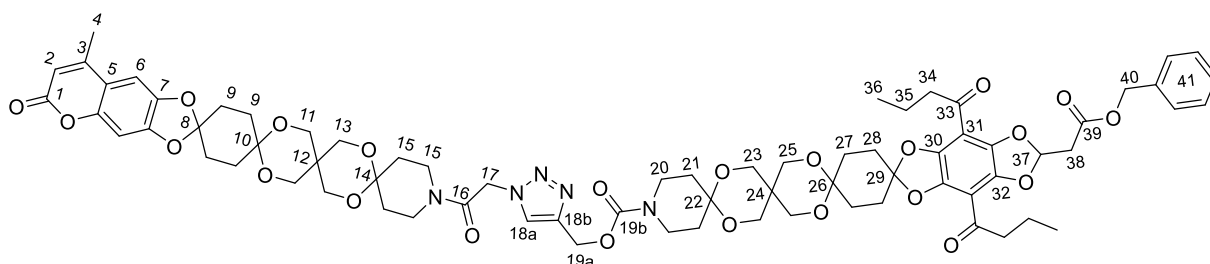
¹³C NMR (δ /ppm, 125 MHz, CDCl₃): 196.3 (C-33), 167.4 (C-39), 163.1 (C-16), 161.3 (C-1), 154.8 (C-19b), 152.6 (C-3), 150.5 (C-5), 150.4 (C-7), 144.5 (C-32), 143.7 (C-18b), 140.8 (C-7), 139.8 (C-30), 135.2 (C-41), 128.6 (C-41), 128.4 (C-41), 128.2 (C-41), 125.4 (C-18a), 120.4 (C-8), 119.8 (C-29), 119.5 (C-31), 111.9 (C-2), 110.1 (C-5), 109.6 (C-37), 102.1 (C-6), 98.3 (C-6), 97.2 (C-14), 96.6 (C-26), 66.9 (C-13, C-25), 66.5 (C-40), 58.5 (C-19a), 51.0 (C-22), 50.3 (C-17), 49.3 (C-10), 45.6 (C-34), 44.7 (C-11), 40.2 (C-20, C-15), 40.0 (C-38), 39.2 (C-20, C-15), 36.7 (C-9, C-21), 34.2 (C-9), 33.4 (C-9, C-21), 31.3 (C-12), 31.2 (C-27, C-28), 31.0 (C-9, C-21), 30.8 (C-23), 29.0 (C-24), 28.6 (C-27, C-28), 19.1 (C-4), 17.2 (C-35), 13.8 (C-36)

F_p: Zersetzung ab 135 °C

IR: 3457, 2959, 2930, 2871, 1687, 1584, 1495, 1467, 1440, 1377, 1348, 1275, 1229, 1206, 1140, 1107, 1081, 1067, 1044, 968, 922, 904, 865, 812, 773, 733, 699 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 1450.4585 [M+H]⁺, berechnet: 1450.4643 C₄₇H₈₄N₅O₁₉S₄

(1-(2-(8''''-Methyl-6''''-oxo-6''''H-tetraspiro[piperidin-4,2'-[1,3]dioxan-5',5''-[1,3]dioxan-2'',1'''-cyclohexan-4''',2''''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen)-1-yl)-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl 6-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-4,8-dibutyryltetraspiro[benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-2,1'-cyclohexan-4',2''-[1,3]dioxan-5'',5''-[1,3]dioxan-2''',4''''-piperidin]-1''''-carboxylat (107)



Das Alkin **105** (40 mg, 0.05 mmol) und das Azid **91** (28 mg, 0.04 mmol, 1.0 eq.) wurden in DCM/MeOH (1:1, 0.5 mL) gelöst. Cu/C (3wt%, 25 mg, 0.01 mmol, 0.2 eq.) und trockenes NEt₃ (8 μ L, 0.05 mmol, 1.1 eq.) wurden zugegeben und die Suspension wurde für 48 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Flashchromatogra-

phie (DCM → DCM/MeOH 25:1) gereinigt. Man erhielt **107** (24 mg, 0.02 mmol, 35%) als orangen Feststoff.

DC: PE/EE 1:1 $R_f = 0.28$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 500 MHz, CDCl_3): 7.81 (br. s., 1H, H-18a), 7.37 – 7.32 (m, 5H, H-41), 6.89 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-6), 6.65 (t, $^3J=5.0$ Hz, 1H, H-37), 6.14 (d, $^4J=0.9$ Hz, 1H, H-2), 5.23 (s, 4H, H-17, H-19), 5.19 (s, 2H, H-40), 3.84 - 3.69 (m, 16H, H-11, H-13, H-23, H-25), 3.69 - 3.61 (m, 2H, H-15, H-20), 3.60 - 3.53 (m, 2H, H-15, H-20), 3.52 - 3.44 (m, 4H, H-15, H-20), 3.10 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-38), 2.82 (t, $^3J=7.3$ Hz, 4H, H-34), 2.35 (s, 3H, H-4), 2.09 – 2.01 (m, 16H, H-9, H-27, H-28), 1.93 - 1.77 (m, 8H, H-15, H-21), 1.75 - 1.60 (m, 4H, H-35), 0.95 (t, $^3J=7.4$ Hz, 6H, H-36)

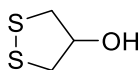
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 125 MHz, CDCl_3): 196.3 (C-33), 167.4 (C-39), 163.1 (C-16), 161.3 (C-1), 154.4 (C-19b), 152.4 (C-3), 150.7 (C-5), 150.5 (C-7), 144.7 (C-32), 143.2 (C-18b), 140.8 (C-7), 139.9 (C-30), 135.3 (C-41), 128.6 (C-41), 128.4 (C-41), 128.2 (C-41), 123.1 (C-18a), 120.4 (C-8), 120.0 (C-31), 113.5 (C-29), 111.9 (C-2), 110.1 (C-5), 109.6 (C-37), 102.0 (C-6), 98.3 (C-6), 97.2 (C-10), 97.1 (C-26), 97.0 (C-14), 96.6 (C-22), 66.9 (C-), 63.7 (C-), 63.5 (C-), 63.4 (C-), 60.3 (C-), 45.6 (C-), 43.6 (C-), 42.2 (C-), 40.7 (C-), 40.0 (C-), 39.3 (C-), 33.2 (C-), 33.1 (C-), 31.2 (C-), 31.0 (C-), 28.6 (C-), 21.0 (C-), 19.1 (C-), 19.1 (C-), 17.2 (C-35), 13.8 (C-36)

F_p : 109 °C

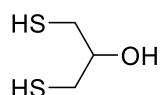
IR: 3523, 2961, 2936, 2872, 1728, 1704, 1694, 1682, 1674, 1668, 1585, 1496, 1471, 1441, 1405, 1379, 1348, 1272, 1256, 1231, 1201, 1168, 1143, 1091, 1046, 1040, 1003, 974, 944, 922, 912, 891, 854, 835, 731 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 1386.5541$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 1386.5557 $\text{C}_{72}\text{H}_{83}\text{N}_5\text{O}_{23}$

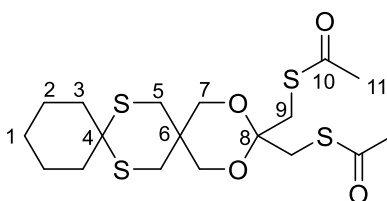
1,2-Dithiolan-4-ol (**109**)^[60]



Schwefel S_8 (0.68 g, 2.67 mmol, 0.25 eq.) und Na_2S (60%, 1.39 g, 10.68 mmol, 1.00 eq.) wurden in trockenem DMF (75 mL) vorgelegt. Nach 4 h Rühren bei 100 °C wurde 1,3-Dibrom-2-propanol **108** (95%, 2.45 g, 10.68 mmol) zugegeben. Die Suspension wurde 2 Tage bei 100 °C gerührt und dann auf ein Eis- H_2O -Gemisch (150 mL) gegossen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **109** (1.31 g, 10.74 mmol, quant.) als einen gelben Feststoff. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

1,3-Disulfanylpropan-2-ol (110)^[60]

LiAlH₄ (0.89 g, 23.58 mmol, 2.2 eq.) wurde in trockenem THF (7 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. **109** (1.31 g, 10.72 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem THF (14 mL) langsam dazu getropft. Nach vollendeter Zugabe wurde 1 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen wurde mit H₂O hydrolysiert, die wässrige Phase mit DCM extrahiert und dann mit 1N HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM) gereinigt. Man erhielt **110** (0.91 g, 7.35 mmol, 69%) als eine farblose Flüssigkeit. Die Analytik stimmt mit der Literatur überein.

S,S'-((2,4-Dioxa-8,15-dithiadispiro[5.2.5.9.26]hexadecan-3,3-diyl)bis(methylen))diethanthioat (118)

2-Oxo-1,3-propandiyldiacetat^[200] **117** (96 mg, 0.47 mmol) und **76** (164 mg, 0.42 mmol, 0.90 eq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) gelöst und TMSOTf (1 Tropfen) wurde zugegeben. Die Lösung wurde für 2h bei RT gerührt. NEt₃ (3 Tropfen) wurde zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 8:1) gereinigt. Man erhielt **118** (142 mg, 0.32 mmol, 70%) als einen weißen Feststoff.

DC: PE/EE 5:1 R_f = 0.34

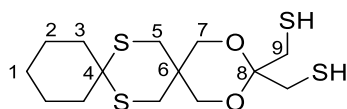
¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 3.86 (s, 4H, H-7), 3.36 (s, 4H, H-9), 2.73 (s, 4H, H-13), 2.41 - 2.29 (m, 6H, H-11), 2.01 - 1.84 (m, 4H, H-3), 1.70 - 1.54 (m, 4H, H-2), 1.49 - 1.38 (m, 1H, H-1)

¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 194.5 (C-10), 98.9 (C-8), 67.1 (C-7), 51.6 (C-4), 37.6 (C-3), 32.7 (C-9), 30.7 (C-5), 30.4 (C-11), 28.7 (C-6), 25.7 (C-1), 22.2 (C-2)

F_p: 105-107 °C

IR: 2981, 2933, 2855, 1689, 1445, 1435, 1420, 1412, 1354, 1310, 1260, 1254, 1209, 1192, 1131, 1102, 1071, 1060, 1022, 1010, 996, 960, 903, 889, 867, 822, 791, 783, 764, 746, 729, 631, 567, 525 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 436.0862 [M]⁺, berechnet: 436.0870 C₁₈H₂₈O₄S₄

(2,4-Dioxa-8,15-dithiadispiro[5.2.59.26]hexadecan-3,3-diyl)dimethanthiol (119)

118 (60 mg, 0.14 mmol) wurde in MeOH (5 mL) gelöst. K_2CO_3 (38 mg, 0.27 mmol, 2.0 eq.) wurde zugegeben und die Suspension bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit H_2O und DCM gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **119** (50 mg, 141 μmol , quant.) als einen weißen Feststoff.

DC: PE/EE 5:1 $R_f = 0.51$

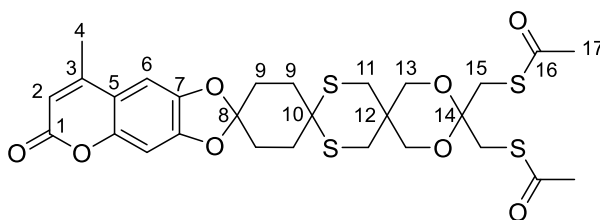
$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3 , als Disulfid): 3.89 (s, 4H, H-7), 3.29 (s, 4H, H-9), 2.73 (s, 4H, H-5), 2.01 - 1.86 (m, 4H, H-3), 1.68 - 1.55 (m, 4H, H-2), 1.50 - 1.40 (m, 2H, H-1)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3 , als Disulfid): 114.5 (C-8), 69.3 (C-7), 51.7 (C-4), 45.5 (C-9), 37.5 (C-3), 30.7 (C-5), 29.1 (C-6), 25.7 (C-1), 22.2 (C-2)

F_p : Zersetzung ab 151 °C

IR: 2970, 2937, 2921, 2893, 2870, 2854, 1465, 1448, 1434, 1415, 1403, 1385, 1333, 1305, 1276, 1263, 1230, 1211, 1196, 1165, 1150, 1131, 1103, 1068, 1057, 1020, 1010, 991, 965, 946, 902, 886, 866, 819, 771, 757, 742, 733, 72, 507 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 352.0640$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 352.0659 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}_4$

S,S'-((8'''-Methyl-6'''-oxo-6'''H-trispiro[[1,3]dioxan-5,5'-[1,3]dithian-2',1''-cyclohexan-4'',2'''-[1,3]-dioxolo[4,5-g]chromon]-2,2-diyl)bis(methylen))diethanthioat (120)

83 (50 mg, 86 μmol) und 2-Oxo-1,3-propandiyldiacetat^[49] **117** (27 mg, 129 μmol , 1.5 eq.) wurden in trockenem DCM (25 mL) gelöst und TMSOTf (1 Tropfen) wurde zugegeben. Die Lösung wurde bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (PE/EE 5:1) gereinigt. Man erhielt **120** (25 mg, 39 μmol , 46%) als farbloses Harz.

DC: PE/EE 5:1 $R_f = 0.54$

¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.89 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-6), 6.14 (s, 1H, H-2), 4.00 - 3.81 (m, 4H, H-13), 3.38 (s, 4H, H-15), 2.84 - 2.69 (m, 4H, H-11), 2.43 - 2.30 (m, 9H, H-4, H-17), 2.30 - 2.20 (m, 4H, H-9), 2.19 - 2.10 (m, 4H, H-9)

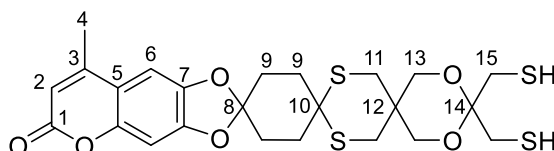
¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 194.9 (C-16), 161.8 (C-1), 152.8 (C-3), 151.0 (C-7), 150.8 (C-5), 145.0 (C-7), 120.0 (C-8), 113.9 (C-5), 112.3 (C-2), 102.5 (C-6), 100.5 (C-6), 98.8 (C-14), 67.4 (C-13), 49.7 (C-10), 34.6 (C-9), 33.2 (C-9), 33.1 (C-9), 31.6 (C-15), 31.5 (C-11), 30.9 (C-17), 29.1 (C-12), 19.5 (C-4)

F_p: 87-89 °C

IR: 2928, 2859, 1713, 1695, 1626, 1584, 1495, 1452, 1443, 1404, 1368, 1348, 1272, 1258, 1225, 1208, 1141, 1109, 1068, 1045, 1001, 966, 924, 908, 863, 731, 628 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 624.0971 [M]⁺, berechnet: 624.0980 C₂₈H₃₂O₈S₄

2,2-Bis(mercaptomethyl)-8'''-methyl-6'''H-trispiro[[1,3]dioxan-5,5'-[1,3]dithian-2',1''-cyclohexan-4'',2'''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6'''-on (116)



Variante 1: 120 (20 mg, 32 μ mol) wurde in MeOH/DCM (2/1 mL) gelöst. K₂CO₃ (9 mg, 64 μ mol, 2.0 eq.) wurde zugegeben und die Suspension bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit H₂O und DCM gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **116** (15 mg, 28 μ mol, 87%) als farbloses Harz.

Variante 2: 115a und **115b** (45 mg) wurden in einer Lösung aus TFA (1%-ig) in trockenem DCM (2 mL) gelöst. Et₃SiH (66 μ L, 0.41 mmol, 10 eq.) wurde zugegeben und es wurde 48h, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, bei RT gerührt. Es wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produktgemisch wurde nicht gereinigt.

DC: PE/EE 1:1 R_f = 0.67

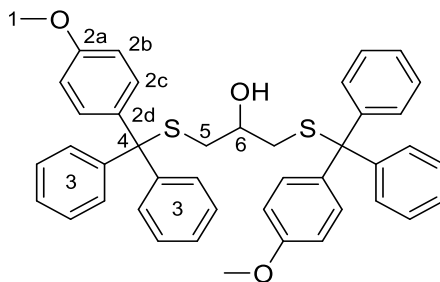
¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.89 (s, 1H, H-6), 6.77 (s, 1H, H-6), 6.17 - 6.13 (m, 1H, H-2), 3.97 - 3.84 (m, 4H, H-13), 3.30 (s, 4H, H-15), 2.83 - 2.68 (m, 4H, H-11), 2.38 - 2.34 (m, 3H, H-4), 2.33 - 2.22 (m, 4H, H-9), 2.21 - 2.10 (m, 4H, H-9)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 112.0 (C-2), 102.1 (C-6), 98.4 (C-6), 69.1 (C-13), 49.1 (C-10), 45.6 (C-15), 45.3 (C-15), 34.2 (C-9), 31.1 (C-11), 31.1 (C-11), 31.0 (C-9), 29.9 (C-12), 19.1 (C-4)

IR: 3449, 3053, 2955, 2925, 2854, 1714, 1626, 1583, 1494, 1451, 1442, 1404, 1368, 1347, 1301, 1270, 1258, 1224, 1207, 1141, 1107, 1066, 1044, 998, 968, 925, 905, 880, 860, 836, 812773, 733, 701, 670, 596, 520 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 539.0661$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 538.0691 $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{S}_4$ (Disulfid)

1,3-Bis(((4-methoxyphenyl)diphenylmethyl)thio)propan-2-ol (**113**)



110 (0.54 g, 4.4 mmol) wurde in trockenem DMF (12 mL) gelöst und 4-Methoxytriphenylmethylchlorid (Mmt-Cl, 2.84 g, 9.2 mmol, 2.1 eq.) wurde zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum (10^{-3}) entfernt. Der Rückstand wurde mit DCM aufgenommen und mit H_2O gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 5:1) gereinigt. Man erhielt **113** (2.14 g, 3.2 mmol, 73%) als einen farblosen, schaumigen Feststoff.

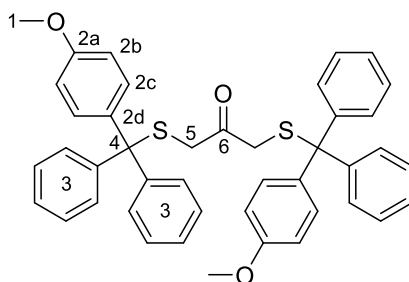
DC: PE/EE 3:1 $R_f = 0.44$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 7.44 - 7.19 (m, 24H, H-3, H-2c), 6.82 (d, $^3J=8.9$ Hz, 4H, H-2b), 3.80 (s, 6H, H-1), 3.16 - 2.96 (m, 1H, H-6), 2.40 - 2.17 (m, 4H, H-5)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 158.1 (C-2a), 144.9 (C-3), 136.6 (C-2d), 130.7 (C-2c), 129.4 (C-3), 127.8 (C-3), 26.6 (C-3), 113.1 (C-2b), 69.0 (C-6), 66.3 (C-4), 55.2 (C-1), 38.4 (C-5)

IR: 3453, 3054, 3030, 2999, 2953, 2929, 2909, 2834, 1733, 1605, 1581, 1506, 1488, 1463, 1442, 1413, 1373, 1295, 1248, 1179, 1144, 1116, 1080, 1031, 1002, 821, 791, 758, 741, 725, 698, 666, 659, 636, 622, 580, 539, 513 cm^{-1}

F_p: Zersetzung ab 90 °C

1,3-Bis(((4-methoxyphenyl)diphenylmethyl)thio)propan-2-on (114)

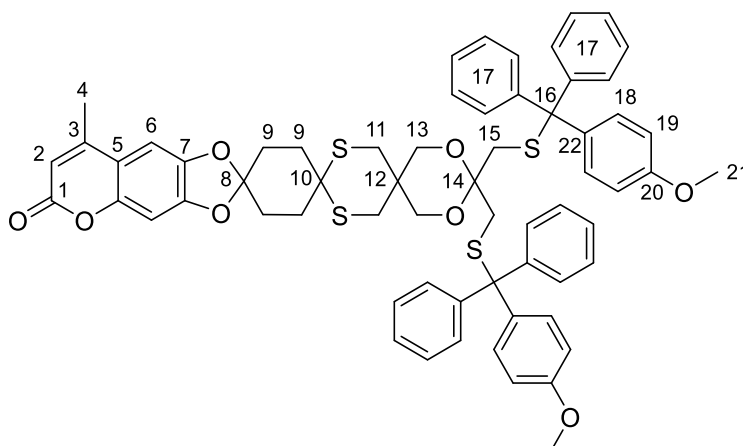
113 (800 mg, 1.20 mmol) wurde in trockenem DMSO (15 mL) gelöst. Trockenes Essigsäureanhydrid (Ac_2O , $\rho = 1.08 \text{ g/mL}$, 1.13 mL, 11.96 mmol, 10 eq.) wurde zugegeben und es wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum (10^{-3}) entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (PE/EE 5:1) gereinigt. Man erhielt **114** (370 mg, 0.55 mmol, 46%) als einen beigen, harzigen Feststoff.

DC: PE/EE 3:1 $R_f = 0.70$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 7.41 - 7.17 (m, 24H, H-3, H-2c), 6.84 - 6.74 (m, 4H, H-2b), 3.80 (s, 6H, H-1), 2.94 (s, 4H, H-5)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 201.3 (C-6), 158.2 (C-2a), 144.4 (C-3), 136.1 (C-2d), 130.7 (C-2c), 129.4 (C-3), 128.0 (C-3), 126.8 (C-3), 113.3 (C-2b), 66.8 (C-4), 55.2 (C-1), 41.7 (C-5)

IR: 3496, 3083, 3057, 3030, 2954, 2932, 2836, 2246, 1710, 1606, 1581, 1507, 1489, 1463, 1443, 1295, 1249, 1179, 1158, 1116, 1032, 907, 824, 792, 758, 727, 698, 622, 580, 538 cm^{-1}

2,2-Bis((((4-methoxyphenyl)diphenylmethyl)thio)methyl)-8'''-methyl-6'''H-trispiro[[1,3]dioxan-5,5'-[1,3]dithian-2',1''-cyclohexan-4'',2'''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6'''-on (115)

83 (50 mg, 86 μmol) und **114** (86 mg, 129 μmol , 1.5 eq.) wurden in trockenem DCM (20 mL) gelöst und TMSOTf (1 Tropfen) wurde zugegeben. Es wurde bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, bei RT gerührt. NEt_3 (2 Tropfen) wurde zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie

(PE/EE 5:1) gereinigt. Man erhielt **115a** (di) (12 mg, 11 μmol , 13%) und das **115b** (mono) (36 mg, 44 μmol , 51%) als farblose, harzige Feststoffe.

DC: PE/EE 1:1 $R_f = 0.44$

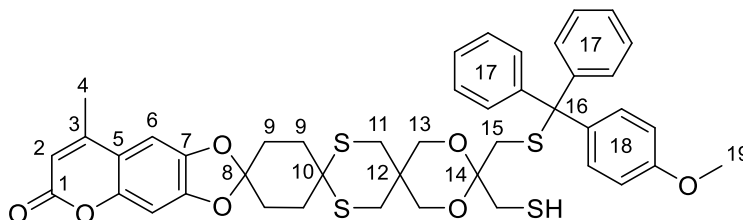
$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 7.53 - 7.11 (m, 24H, H-17, H-18), 6.93 - 6.70 (m, 6H, H-6, H-19), 6.15 (s, 1H, H-2), 3.79 (s, 6H, H-21), 3.47 - 3.41 (m, 4H, H-13), 2.62 - 2.51 (m, 8H, H-11, H-15), 2.36 (s, 3H, H-4), 2.25 - 2.19 (m, 4H, H-9), 2.15 - 2.10 (m, 4H, H-9)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 161.4 (C-1), 158.1 (C-20), 152.5 (C-3), 150.6 (C-7), 150.4 (C-5), 144.9 (C-7), 144.6 (C-17), 136.6 (C-22), 130.9 (C-18), 129.5 (C-17), 127.9 (C-17), 126.6 (C-17), 119.7 (C-8), 113.5 (C-5), 113.1 (C-19), 111.9 (C-2), 102.0 (C-6), 99.9 (C-28), 98.4 (C-6), 66.4 (C-13), 65.8 (C-16), 55.2 (C-21), 49.2 (C-10), 36.3 (C-15), 35.8 (C-), 34.2 (C-9), 31.2 (C-9), 31.1 (C-11), 28.2 (C-12), 19.1 (C-4)

F_p : Zersetzung ab 65 °C

IR: 3057, 2954, 2931, 2860, 1718, 1626, 1606, 1584, 1508, 1495, 1452, 1443, 1405, 1368, 1348, 1272, 1253, 1225, 1207, 1181, 1161, 1142, 1109, 1067, 1033, 924, 908, 734, 701 cm^{-1}

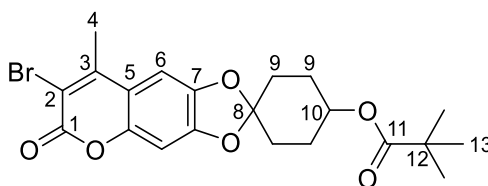
2-(Mercaptomethyl)-2-(((4-methoxyphenyl)diphenylmethyl)thio)methyl)-8'''-methyl-6'''H-trispiro[[1,3]dioxan-5,5'-[1,3]dithian-2',1''-cyclohexan-4'',2'''-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen]-6'''-on (115b)



DC: PE/EE 1:1 $R_f = 0.31$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 7.63 - 7.16 (m, 12H, H-17, H-18), 6.78 (s, 4H, H-6, H-18), 6.16 (s, 1H, H-2), 3.80 (s, 3H, H-19), 3.58 - 3.39 (m, 4H, H-13), 2.85 - 2.75 (m, 1H, H-15), 2.63 - 2.53 (m, 3H, H-11, H-15), 2.37 (s, 3H, H-4), 2.33 - 2.21 (m, 4H, H-9), 2.20 - 2.09 (m, 4H, H-9)

7'-Brom-8'-methyl-6'-oxo-6'H-spiro[cyclohexan-1,2'-[1,3]dioxol[4,5-g]chromen]-4-yl-pivalat (122b)



19 (300 mg, 0.80 mmol), NBS (157 mg, 0.89 mmol, 1.1 eq.) und $(\text{PhCOO})_2$ (2 mg, 8.06 μmol , 0.01 eq.) wurden in CCl_4 (10 mL) für 8 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene Succinimid abfiltriert und verworfen. Die organische Phase wurde mit H_2O gewaschen, über MgSO_4

getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (Hex/EE 4:1) gereinigt. Man erhielt **122b** (169 mg, 0.37 mmol, 46%) als einen gelben Feststoff.

DC: Hex/EE 3:1 $R_f = 0.49$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 6.95 (s, 1H, H-6), 6.76 (s, 1H, H-6), 5.05 - 4.95 (m, 1H, H-10), 2.56 (s, 3H, H-4), 2.18 - 1.90 (m, 8H, H-9), 1.23 (s, 9H, H-13)

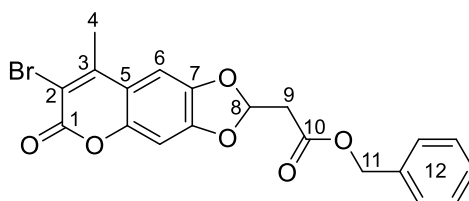
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 177.7 (C-11), 168.5 (C-1), 157.4 (C-3), 150.8 (C-7), 148.8 (C-5), 145.2 (C-7), 120.2 (C-8), 113.4 (C-5), 107.7 (C-2), 102.4 (C-6), 98.1 (C-6), 67.8 (C-10), 38.9 (C-12), 31.0 (C-9), 27.2 (C-13), 27.2 (C-9), 20.0 (C-4)

F_p : 193 °C

IR: 3418, 2962, 2872, 1719, 1630, 1562, 1493, 1464, 1442, 1397, 1379, 1360, 1319, 1272, 1252, 1217, 1167, 1147, 1121, 1073, 1025, 1004, 965, 934, 908, 867, 817, 772, 743, 618 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 450.0661$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 450.0678 $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BrO}_6$

Benzyl-2-(7-brom-8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)acetat (**123**)



12 (560 mg, 1.59 mmol) wurde in trockenem ACN (10 mL) gelöst. NBS (567 mg, 318 mmol, 2 eq.) und NaOAc (13 mg, 0.16 mmol, 0.1 eq.) wurden hinzugegeben und es wurde bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit DCM extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (PE/EE 5:1) gereinigt. Man erhielt **123** (680 mg, 1.58 mmol, quant.) als einen weißen Feststoff.

DC: PE/EE 3:1 $R_f = 0.35$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 7.34 (s, 5H, H-12), 6.96 (s, 1H, H-6), 6.77 (s, 1H, H-6), 6.66 (t, $^3J=5.0$ Hz, 1H, H-8), 5.19 (s, 2H, H-11), 3.09 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-9), 2.54 (s, 3H, H-4)

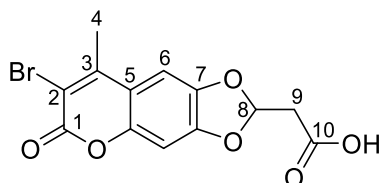
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 167.8 (C-10), 157.7 (C-1), 151.3 (C-7), 151.0 (C-3), 149.3 (C-5), 145.5 (C-7), 135.4 (C-12), 129.0 (C-12), 128.9 (C-12), 128.8 (C-12), 114.1 (C-5), 110.8 (C-2), 110.2 (C-8), 103.0 (C-6), 98.6 (C-6), 67.6 (C-11), 40.5 (C-9), 20.4 (C-4)

F_p : 102-103 °C

IR: 2953, 2918, 1739, 1713, 1630, 1556, 1488, 1445, 1440, 1379, 1317, 1256, 1208, 1165, 1148, 1108, 1062, 1024, 971, 853, 745, 734, 699, 615, 607, 524, 510, 495 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 430.0056 [M]^+$, berechnet: 430.0052

2-(7-Brom-8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)essigsäure (124)



123 (350 mg, 0.81 mmol) wurde in trockenem THF (70 mL) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Pd/C (10%) wurde die Suspension unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, wurde die Suspension über Celite® abfiltriert, mit MeOH und DCM gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in DCM gelöst und **124** wurde durch Zugabe von 2 Tropfen Oxalylchlorid ausgefällt und abfiltriert. Man erhielt **124** (227 mg, 0.67 mmol, 82%) als ein weißer Feststoff.

DC: DCM/MeOH 10:1 $R_f = 0.11$

1H NMR (δ /ppm, 300 MHz, Aceton- d_6): 7.24 (s, 1H, H-6), 6.89 (s, 1H, H-6), 6.70 (t, $^3J=4.9$ Hz, 1H, H-8), 3.12 (d, $^3J=5.1$ Hz, 2H, H-9), 2.59 (s, 3H, H-4)

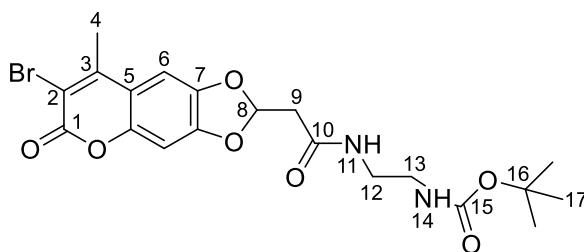
^{13}C NMR (δ /ppm, 75 MHz, Aceton- d_6): 169.3 (C-10), 157.2 (C-1), 152.4 (C-7), 151.9 (C-4), 149.9 (C-5), 146.2 (C-7), 114.5 (C-5), 111.6 (C-8), 110.5 (C-2), 104.0 (C-6), 98.5 (C-6), 40.1 (C-9), 20.3 (C-4)

F_p : Zersetzung ab 200 °C

IR: 3076, 2964, 2916, 1697, 1627, 1556, 1493, 1436, 1399, 1368, 1320, 1306, 1264, 1233, 1208, 1196, 1156, 1097, 1062, 1043, 1024, 972, 962, 882, 847, 838, 750, 675, 612 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 339.9585 [M]^+$, berechnet: 339.9582

tert-Butyl(2-(2-(7-brom-8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)acetamid)ethyl)-carbammat (125)



124 (100 mg, 0.29 mmol) und *tert*-Butyl(2-aminoethyl)carbammat (**60**, 47 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) wurden in trockenem DCM (40 mL) vorgelegt. DCC (67 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) und HOBt (44 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) wurden hinzugegeben und es wurde bis zum vollständigen Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, bei RT gerührt. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Hälfte eingengt. Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert, woraufhin die organische

Phase mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet wurde. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 25:1) gereinigt. Man erhielt **125** (131 mg, 0.28 mmol, 95%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.16$

¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 6.95 (s, 1H, H-6), 6.93 – 6.85 (m, 1H, H-11), 6.73 (s, 1H, H-6), 6.65 (t, ³J=5.3 Hz, 1H, H-8), 5.06 (t, ³J=5.6 Hz, 1H, H-14), 3.49 - 3.35 (m, 2H, H-12), 3.35 - 3.21 (m, 2H, H-13), 2.91 (d, $J=5.1$ Hz, 2H, H-9), 2.52 (s, 3H, H-4), 1.55 - 1.34 (m, 9H, H-17)

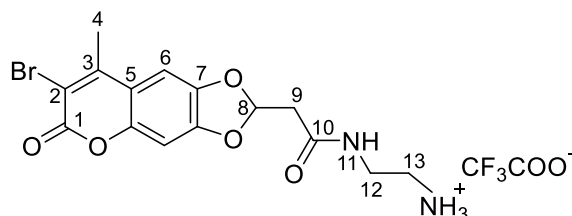
¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 167.0 (C-10), 157.3 (C-1), 151.0 (C-7), 150.7 (C-3), 148.7 (C-5), 145.1 (C-7), 113.6 (C-5), 110.9 (C-8), 110.1 (C-2), 102.5 (C-6), 98.1 (C-6), 79.8 (C-16), 41.9 (C-9), 41.1 (C-13), 40.0 (C-12), 28.3 (C-17), 20.0 (C-4)

F_p: 182-183 °C

IR: 3335, 3074, 2976, 2931, 2856, 1706, 1655, 1555, 1523, 1493, 1444, 1391, 1367, 1321, 1257, 1211, 1169, 1152, 1081, 1062, 1023, 973, 852, 749, 612 cm⁻¹

MS: (EI) $m/z = 482.0678$ [M]⁺, berechnet: 482.0689

2-(2-(7-Brom-8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)acetamido)ethan-1-aminium-2,2,2-trifluoracetat (126)



125 (103 mg, 0.21 mmol) wurde in DCM/TFA (3:1; 4 mL) gelöst und für 30 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer und im Hochvakuum (1·10⁻³ mbar) entfernt. Man erhielt **125** (106 mg, 0.21 mmol, quant.) als einen weißen harzartigen Feststoff.

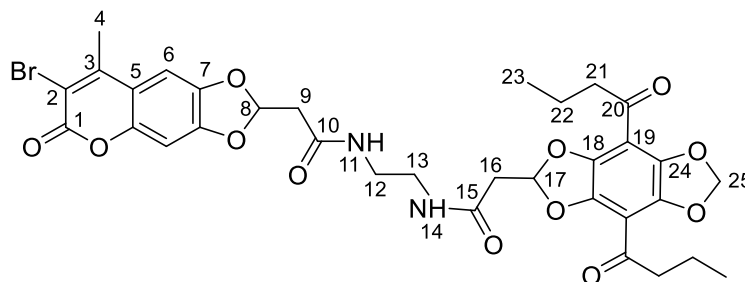
¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, MeOD-*d*₄): 7.26 (s, 1H, H-6), 6.92 (s, 1H, H-6), 6.68 (t, ³J=5.1 Hz, 1H, H-8), 3.48 (t, ³J=6.1 Hz, 2H, H-12), 3.05 (t, ³J=6.1 Hz, 2H, H-13), 2.98 (d, ³J=5.1 Hz, 2H, H-9), 2.61 (s, 3H, H-4)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, MeOD-*d*₄): 170.9 (C-10), 159.1 (C-1), 153.7 (C-7), 152.6 (C-3), 150.3 (C-5), 146.9 (C-7), 115.1 (C-5), 112.5 (C-8), 110.5 (C-2), 104.2 (C-6), 98.9 (C-6), 42.3 (C-9), 40.8 (C-13), 38.3 (C-12), 20.4 (C-4)

IR: 3073, 2958, 2928, 2859, 1671, 1631, 1553, 1492, 1444, 1391, 1322, 1257, 1203, 1180, 1134, 1029, 976, 838, 80, 749, 722, 640, 612 cm⁻¹

MS: (EI) $m/z = 382.0164$ [M]⁺ berechnet für die Base C₁₅H₁₅Br N₂O₅, berechnet: 382.0176

2-(7-Brom-8-methyl-6-oxo-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-2-yl)-N-(2-(2-(4,8-dibutyrylbenzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-2-yl)acetamido)ethyl)acetamid (127)



127 (10 mg, 0.03 mmol) wurde in trockenem DCM (5 mL) suspendiert. Oxalylchlorid (12 μ L, 0.14 mmol, 5 eq.) wurde vorsichtig hinzuge tropft und es wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Säurechlorid, welches sich vollständig in DCM löst, wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde es in trockenem DCM (2 mL) gelöst und vorsichtig zu einer Lösung aus **125** (15 mg, 0.03 mmol, 1.1 eq.) und DIPEA (48 μ L, 0.27 mmol, 10 eq.) in trockenem DCM (5 mL) getropft. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wurde der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **127** (18 mg, 0.02 mmol, 90%) als einen orangenen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 R_f = 0.35

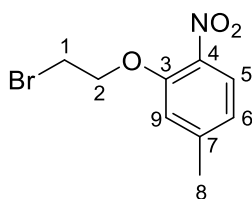
$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 600 MHz, CDCl_3): 6.94 (s, 1H, H-6), 6.75 (s, 1H, H-6), 6.70 (t, $^3J=5.5$ Hz, 1H, H-17), 6.57 (t, $^3J=5.5$ Hz, 1H, H-8), 6.37 (t, $^3J=5.8$ Hz, 1H, H-14), 6.11 (dd, $^3J=1.1, 7.2$ Hz, 2H, H-25), 3.55 - 3.45 (m, 4H, H-12, H-13), 3.03 (dd, $^3J=1.7, 5.5$ Hz, 2H, H-16), 2.94 (d, $^3J=5.3$ Hz, 3H, H-9), 2.85 (dt, $^3J=2.4, 7.2$ Hz, 4H, H-21), 2.52 (s, 1H, H-4), 1.67 – 1.62 (m, 4H, H-20), 0.95 – 0.92 (m, 6H, H-23)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 195.5 (C-20), 172.8 (C-10, C-15), 156.6 (C-3), 144.9 (C-7), 140.5 (C-5), 140.1 (C-7), 103.3 (C-25), 97.7 (C-6), 45.9 (C-21), 43.2 (C-16), 41.6 (C-9), 40.4 (C-12, C-13), 23.4 (C-4), 18.5 (C-22), 13.9 (C-23)

F_p: 213-214 °C

IR: 3286, 3087, 2956, 2929, 2874, 1723, 1684, 1648, 1559, 1492, 1440, 1405, 1394, 1284, 1259, 1241, 1209, 1108, 1091, 936, 848, 748 cm^{-1}

MS: (EI) m/z = 729.1270 $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet: 729.1295

2-(2-Bromethoxy)-4-methyl-1-nitrobenzol (132)^[109]

5-Methyl-2-nitrophenol **131** (21.5 g, 140.4 mmol) und K_2CO_3 (38.81 g, 280.8 mmol, 2.0 eq.) wurden in trockenem DMF (100 mL) vorgelegt und 30 min bei 50 °C gerührt. Zur rot-orangen Suspension wurden 1,2-Dibromethan (87.0 g, 39.9 mL, 463.3 mmol, 3.3 eq.) und trockenes DMF (70 mL) zugegeben. Die nun gelb-viskose Suspension wurde 2h unter Rückfluss erhitzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde noch einmal für 2h unter Rückfluss erhitzt und nahm eine dunkelrote Färbung an. Nach Abkühlung wurde der weiße Feststoff (1,2-Bis(5-methyl-2-nitrophenoxy)ethan) abfiltriert und mit Wasser und DCM gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit erst mit verdünnter NaOH-Lösung und dann mit gesättigter NaCl-Lösung (+ wenig NaH_2PO_4) gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeeengt und im Hochvakuum (10^{-3} mbar) vom restlichen DMF befreit. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/Hex 2:1) gereinigt. Man erhielt **132** (10.2 g, 39.2 mmol, 28%) als einen weißen Feststoff.

DC: PE/EE 3:1 $R_f = 0.78$

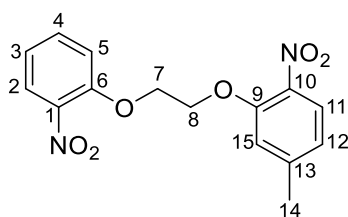
1H NMR (δ /ppm, 300 MHz, $CDCl_3$): 7.82 - 7.75 (m, 1H, H-5), 6.91 - 6.84 (m, 2H, H-9, h-6), 4.40 (t, $^3J=6.5$ Hz, 2H, H-2), 3.68 (t, $^3J=6.5$ Hz, 2H, H-1), 2.42 (s, 3H, H-8)

^{13}C NMR (δ /ppm, 75 MHz, $CDCl_3$): 151.5 (C-3), 145.8 (C-7), 144.2 (C-4), 125.8 (C-5), 122.0 (C-6), 115.9 (C-9), 69.6 (C-2), 28.1 (C-1), 21.8 (C-8)

F_p: 45 °C

IR: 3114, 3050, 3031, 2975, 2932, 2878, 2765, 1909, 1607, 1592, 1505, 1453, 1422, 1390, 1344, 1315, 1276, 1265, 1233, 1183, 1161, 1091, 1068, 1007, 968, 958, 866, 849, 826, 817, 752, 725, 696, 636, 575 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 258.9845 [M]^+$, berechnet: 258.9844 $C_9H_{10}BrNO_3$

4-Methyl-1-nitro-2-(2-(2-nitrophenoxy)ethoxy)benzol (133)^[109]

2-Nitrophenol (4.8 g, 34.6 mmol, 1.0 eq.) und K_2CO_3 (7.2 mg, 51.9 mmol, 1.5 eq.) wurden in trockenem DMF (40 mL) vorgelegt und 30 min auf 45 °C erhitzt. **132** (9.9 g, 38.1 mmol) wurde zugegeben und die Suspension wurde für 2h auf 130 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der dunkelroten Suspension wurde diese in Wasser (200 mL) gegossen und der ausgefallene orange Feststoff abfiltriert. Dieser wurde mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung und Wasser gewaschen. DCM wurde zugegeben und der größte Teil des Feststoffes aufgelöst und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **133** (10.5 g, 33.0 mmol, 95%) als einen orangen Feststoff.

DC: PE/EE 3:1 $R_f = 0.27$

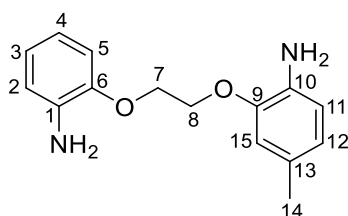
1H NMR (δ /ppm, 300 MHz, $CDCl_3$): 7.82 (dd, $^3J=1.7$, 8.1 Hz, 1H, H-2), 7.77 (d, $^3J=8.3$ Hz, 1H, H-11), 7.57 (ddd, $^3J=1.8$, 7.5, 8.4 Hz, 1H, H-4), 7.25 (dd, $^3J=0.9$, 8.5 Hz, 1H, H-5), 7.12 - 7.04 (m, 1H, H-3), 7.02 (s, 1H, H-15), 6.89 - 6.83 (m, 1H, H-12), 4.57 - 4.48 (m, 4H, H-7, H-8), 2.44 (s, 3H, H-14)

^{13}C NMR (δ /ppm, 75 MHz, $CDCl_3$): 152.1 (C-6), 151.8 (C-9), 146.2 (C-13), 134.3 (C-4), 125.7 (C-2), 125.5 (C-11), 122.0 (C-3), 121.2 (C-12), 116.4 (C-5), 115.8 (C-15), 68.7 (C-7), 68.6 (C-8), 21.8 (C-14)

F_p : 151-152 °C

IR: 2960, 2932, 2874, 1604, 1590, 1510, 1488, 1453, 1412, 1342, 1309, 1276, 1251, 1181, 1166, 1153, 1091, 1055, 971, 932, 894, 853, 841, 815, 800, 772, 752, 742, 690, 673, 638, 610, 601, 578, 513 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 318.0867$ [M]⁺, berechnet: 318.0852 $C_{15}H_{14}N_2O_6$

2-(2-(2-Aminophenoxy)ethoxy)-4-methylanilin (134)^[78]

133 (10.4 g, 32.7 mmol) wurde in EtOH (100 mL) mit Pd/C (10%, 1.0 g, 0.98 mmol, 0.03 eq.) unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei RT hydriert. Nach vollständigem Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, wurde die Suspension erhitzt und über Celite® abfiltriert. Es wurde mit EtOH gewaschen und das Filtrat mit Eis gekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Man erhielt **134** (7.6 g, 29.5 mmol, 90%) als einen rosafarbenen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 100:1 $R_f = 0.18$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 6.92 - 6.81 (m, 2H, H-11, H-2), 6.79 - 6.75 (m, 1H, H-4), 6.75 - 6.72 (m, 1H, H-5), 6.72 - 6.69 (s, 1H, H-3), 6.68 - 6.63 (m, 2H, H-12, H-15), 4.37 (s, 4H, H-7, H-8), 3.72 (s, 4H, NH_2), 2.29 (s, 3H, H-14)

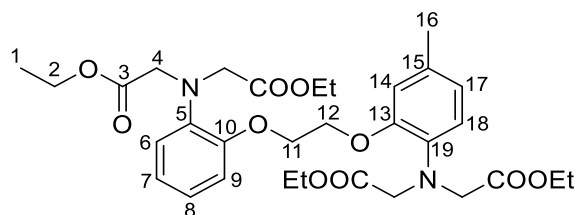
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 146.2 (C-6), 146.2 (C-9), 136.7 (C-1), 134.0 (C-10), 128.0 (C-13), 122.0 (C-3), 121.8 (C-12)

F_p : 118-119 °C

IR: 3439, 3359, 3050, 2957, 2918, 2881, 2860, 1609, 1591, 1519, 1504, 1459, 1435, 1386, 1339, 1270, 1249, 1238, 1212, 1161, 1143, 1122, 1080, 1059, 1035, 1008, 966, 933, 893, 848, 813, 775, 734, 622, 583, 560, 538 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 258.1365$ [M] $^+$, berechnet: 258.1368 $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$

Diethyl-2,2'-((2-(2-(2-(bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)phenyl)-azandiyl)-diacetat (135**)**^[109,171]



135 (3.5 g, 13.55 mmol), DIPEA (10.6 mL, 60.97 mmol, 4.5 eq.) und Ethyl-2-bromacetat (6.9 mL, 60.97 mmol, 4.5 eq.) wurden in ACN (10 mL) vorgelegt und 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung der rot-braunen Lösung wurde diese in EE (40 mL) gegossen und der entstandene weiße Feststoff abfiltriert und verworfen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Feststoff wurde in MeOH umkristallisiert. Man erhielt **135** (7.0 g, 11.64 mmol, 86%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.28$

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 6.96 - 6.79 (m, 4H, H-6, H-7, H-8, H-9), 6.79 - 6.59 (m, 3H, H-14, H-18, H-17), 4.28 (s, 4H, H-11, H-12), 4.18 - 4.11 (m, 8H, H-4), 4.11 - 3.98 (m, 8H, H-2), 2.26 (s, 3H, H-16), 1.15 (dt, $^3J = 2.0, 7.1$ Hz, 12H, H-1)

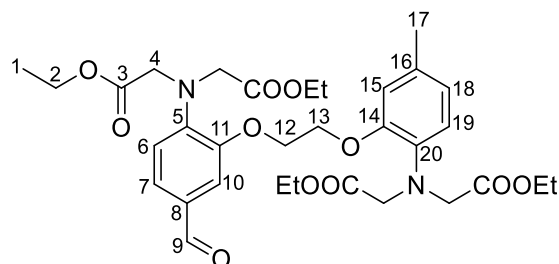
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 171.6 (C-39), 171.6 (C-39), 150.3 (C-10), 150.2 (C-13), 139.4 (C-19), 136.9 (C-5), 132.0 (C-15), 122.1 (C-8), 121.7 (C-17), 121.4 (C-18), 119.1 (C-9), 119.0 (C-7), 114.2 (C-14), 113.3 (C-6), 67.1 (C-11), 67.0 (C-12), 60.7 (C-2), 60.6 (C-2), 53.6 (C-4), 53.5 (C-4), 20.9 (C-16), 14.0 (C-1)

F_p : 111 °C

IR: 3066, 3040, 2980, 2914, 1750, 1739, 1730, 1596, 1579, 1518, 1507, 1466, 1456, 1450, 1416, 1393, 1371, 1355, 1345, 1310, 1260, 1240, 1216, 1186, 1172, 1138, 1126, 1071, 1060, 1026, 975, 965, 931, 922, 911, 868, 850, 803768, 742, 625, 588, 561 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 602.2857 [M]^+$, berechnet: 602.2839 $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{10}$

Diethyl-2,2'-((2-(2-(2-(bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-5-formylphenoxy)ethoxy)-4-methylphenyl)azandiyl)diacetat (136)^[171]



135 (3.0 g, 4.99 mmol) wurde in einem Gemisch aus trockenem DMF/Pyridin (6 mL/0.5 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. POCl_3 (6.1 g, 39.95 mmol, 8.0 eq.) wurde tropfenweise zugefügt. Die schwarze Lösung wurde zunächst für 30 min bei RT gerührt, dann für 1h bei 60 °C und abschließend über Nacht bei RT. DCM wurde zugegeben und die Mischung auf ein Gemisch aus Eis/NaOH (aq.) gegossen. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit DCM gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden vereinigt, mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die erhaltene orange-viskose Lösung wurde über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Der Feststoff wurde abfiltriert und im Hochvakuum (10^{-3} mbar) getrocknet. Man erhielt **136** (2.7 g, 4.61 mmol, 86%) als einen gelben Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.35$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 9.79 (s, 1H, H-9), 7.44 - 7.34 (m, 2H, H-7, H-10), 6.79 - 6.64 (m, 4H, H-6, H-15, H-19, H-18), 4.45 - 4.21 (m, 8H, H-4), 4.14 - 3.97 (m, 12H, H-2, H-12, H-13), 2.26 (s, 3H, H-18), 1.15 (dt, $^3J=1.5, 7.2$ Hz, 10H, H-1)

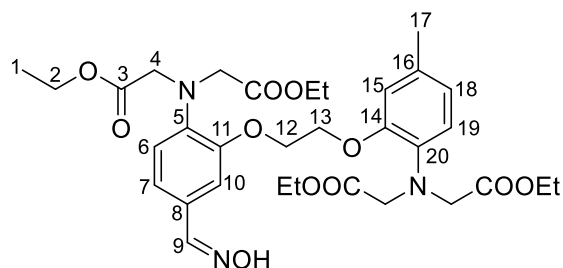
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 190.5 (C-9), 171.5 (C-3), 170.8 (C-3), 150.1 (C-11), 149.6 (C-14), 145.1 (C-5), 136.9 (C-20), 132.0 (C-16), 129.9 (C-8), 126.5 (C-7), 121.9 (C-19), 119.3 (C-18), 116.6 (C-6), 114.4 (C-15), 111.1 (C-10), 67.4 (C-12), 66.7 (C-13), 61.1 (C-2), 60.6 (C-2), 53.7 (C-4), 53.5 (C-4), 20.9 (C-17), 14.0 (C-1)

F_p : 115 °C

IR: 2980, 2907, 2820, 2730, 1741, 1729, 1702, 1682, 1592, 1570, 1515, 1477, 1448, 1429, 1416, 1396, 1371, 1355, 1342, 1297, 1241, 1212, 1188, 1170, 1136, 1060, 1052, 1024, 974, 967, 919, 901, 871, 850, 803, 766, 746, 726, 624, 605, 589, 572, 561, 510, 484 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 630.2775 [M]^+$, berechnet: 630.2789 $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{11}$

Diethyl-2,2'-((2-(2-(2-(bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-5-((hydroxyimino)methyl)phenoxy)ethoxy)-4-methylphenyl)azandiyl)-diacetat (137)



136 (1.50 g, 2.38 mmol) wurde in EtOH (20 mL) vorgelegt. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (337.70 mg, 4.76 mmol, 2.0 eq.) in H_2O (1 mL) und 3M NaOAc-Lösung (1.19 mL, 3.57 mmol, 1.5 eq.) wurden zugegeben. Die Lösung wurde für 4 h bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. H_2O wurde zugegeben, der ausgefallene weiße Feststoff abfiltriert und im Hochvakuum (10^{-3} mbar) getrocknet. Man erhielt **137** (1.48 g, 2.29 mmol, 96%) als einen weißen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.35$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 8.01 (s, 1H, H-9), 7.18 (s, 1H, H-10), 6.98 (dd, $J=1.6, 8.2$ Hz, 1H, H-19), 6.78 - 6.70 (m, 2H, H-18, H-15), 6.70 - 6.64 (m, 2H, H-6, H-7), 4.33 - 4.23 (m, 4H, H-12, H-13), 4.17 (s, 4H, H-4), 4.12 (s, 4H, H-4), 4.05 (dq, $^3J=2.7, 7.1$ Hz, 10H, H-2), 2.26 (s, 3H, H-17), 1.14 (dt, $^3J=1.6, 7.1$ Hz, 12H, H-1)

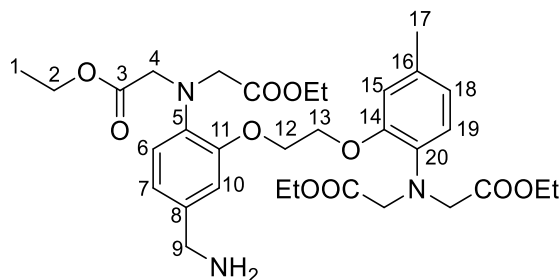
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 171.7 (C-3), 171.3 (C-3), 150.2 (C-11), 150.1 (C-14), 149.8 (C-9), 141.1 (C-5), 136.9 (C-20), 132.0 (C-16), 125.5 (C-8), 121.8 (C-7), 121.7 (C-19), 119.3 (C-18), 117.9 (C-6), 114.2 (C-15), 110.0 (C-10), 67.3 (C-12), 66.9 (C-13), 60.9 (C-2), 60.7 (C-2), 53.6 (C-4), 53.5 (C-4), 20.9 (C-17), 14.0 (C-1)

F_p: 70 °C

IR: 3438, 3295, 2979, 2909, 1743, 1731, 1601, 1569, 1518, 1477, 1459, 1433, 1415, 1393, 1372, 1355, 1346, 1334, 1315, 1299, 1250, 1238, 1223, 1176, 1141, 1116, 1100, 1062, 1025, 976, 961, 952, 914, 898, 849, 799, 782, 768, 730, 627, 612, 587 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 645.2895$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 645.2898 $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{11}$

Diethyl-2,2'-((4-(aminomethyl)-2-(2-(2-(bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)-phenyl)azandiyl)diacetat (138)



137 (1.0 g, 1.55 mmol) und Zink-Staub (506.2 mg, 7.74 mmol, 5.0 eq.) wurden in AcOH (10 mL) für 4 h gerührt. DCM wurde zugegeben und der Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH/NEt₃ 10:1:0.1) gereinigt. Man erhielt **137** (1.48 g, 2.29 mmol, 96%) als ein beiges Harz.

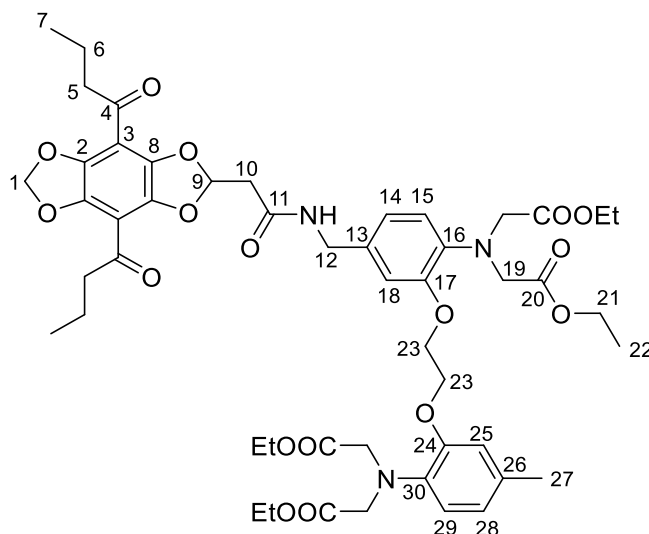
¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, MeOD): 7.10 (s, 1H, H-10), 6.94 (d, *J*=1.9 Hz, 1H, H-19), 6.85 - 6.64 (m, 4H, H-15, H-18, H-6, H-7), 4.40 - 4.20 (m, 4H, H-12, H-13), 4.14 (s, 4H, H-4), 4.09 (s, 4H, H-4), 4.05 - 3.91 (m, 12H, H-2), 3.35 (s, 2H, H-9), 2.27 (s, 3H, H-17), 1.19 - 1.07 (m, 12H, H-1)

¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, MeOD): 173.5 (C-3), 173.2 (C-3), 151.9 (C-11), 151.7 (C-14), 141.3 (C-5), 138.2 (C-20), 133.4 (C-16), 128.0 (C-8), 123.1 (C-7), 122.7 (C-19), 120.4 (C-18), 119.6 (C-6), 115.4 (C-15), 115.1 (C-10), 69.0 (C-12), 68.5 (C-13), 62.1 (C-2), 62.0 (C-2), 54.9 (C-4), 54.8 (C-4), 44.3 (C-9), 21.1 (C-17), 14.6 (C-1)

IR: 3394, 2983, 2909, 2639, 1737, 1611, 1576, 1560, 1520, 1477, 1443, 1415, 1400, 1372, 1355, 1349, 1313, 1296, 1255, 1168, 1116, 1067, 1025, 975, 967, 901, 802, 769, 730 cm⁻¹

MS: (EI) *m/z* = 631.3117 [M]⁺, berechnet: 631.3105 C₃₂H₄₅N₃O₁₀

**Diethyl-2,2'-((2-(2-(2-(bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-5-((2-(4,8-dibutyrylbenzo[1,2-*d*:4,5-*d'*)]bis-
([1,3]dioxol)-2-yl)acetamido)methyl)phenoxy)ethoxy)-4-methylphenyl)azandiyl)diacetat (**128**)**



24 (33.0 mg, 90.6 μmol) wurde in trockenem DCM (5 mL) gelöst. Oxalylchlorid (40 μL , 0.45 mmol, 5.0 eq.) wurde zugegeben und es wurde 5 h bei RT gerührt. Die Säure löst sich nicht vollständig in DCM, das Säurechlorid hingegen vollständig. Restliches Oxalylchlorid und das Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Das Säurechlorid wurde in trockenem DCM (5 mL) aufgenommen und zu einer Lösung aus **138** (68.7 mg, 0.11 mmol, 1.3 eq.), DIPEA (31.6 μL , 0.18 mmol, 2.0 eq.) und trockenem DCM (6 mL) bei 0 °C getropft. Die Lösung wurde 4 h bei RT gerührt, mit Wasser gequench und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittel Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **128** (89.5 mg, 91.5 μmol , quant.) als einen orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.33$

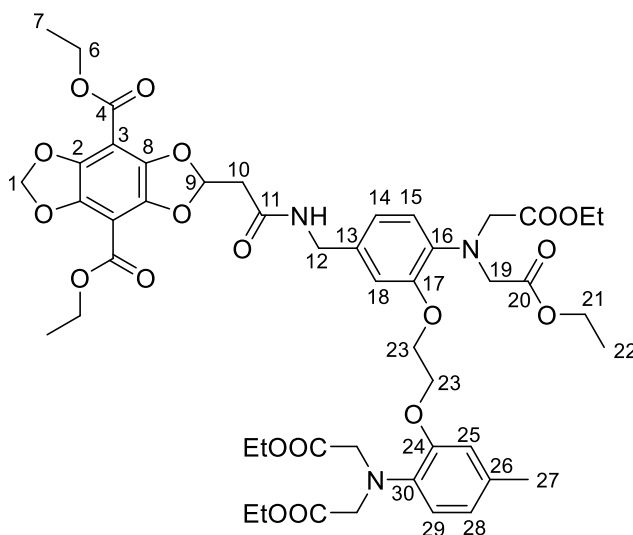
$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 6.76 (dd, $^3J=6.4$, 13.6 Hz, 4H, H-15, H-25, H-28, H-29), 6.70 - 6.62 (m, 3H, H-9, H-18, H-14), 6.50 (br. s., 1H, NH), 6.16 (s, 1H, H-1), 6.08 (s, 1H, H-1), 4.36 (d, $^3J=5.3$ Hz, 2H, H-12), 4.26 (s, 4H, H-23), 4.12 - 3.96 (m, 16H, H-19, H-21), 2.93 (d, $^3J=4.9$ Hz, 2H, H-10), 2.86 (t, $^3J=7.2$ Hz, 4H, H-5), 2.25 (s, 4H, H-27), 1.78 - 1.60 (4H, H-6), 1.15 (dt, $^3J=4.1$, 7.2 Hz, 12H, H-22), 0.96 (t, $^3J=7.3$ Hz, 6H, H-7)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 196.3 (C-4), 171.6 (C-20), 171.4 (C-20), 165.9 (C-11), 150.3 (C-24), 150.2 (C-17), 141.1 (C-2), 140.3 (C-8), 138.9 (C-30), 136.7 (C-16), 132.1 (C-13), 131.6 (C-26), 121.8 (C-29), 120.9 (C-28), 119.3 (C-15), 118.9 (C-14), 114.4 (C-18), 113.4 (C-25), 110.5 (C-9), 109.9 (C-3), 102.7 (C-1), 67.4 (C-23), 67.1 (C-23), 60.6 (C-21), 60.4 (C-21), 53.6 (C-19), 53.4 (C-19), 45.6 (C-5), 43.3 (C-12), 41.9 (C-10), 20.9 (C-27), 17.1 (C-6), 14.0 (C-22), 13.7 (C-7)

IR: 3364, 2977, 2964, 2934, 2876, 1744, 1684, 1611, 1578, 1572, 1564, 1518, 1477, 1464, 1437, 1416, 1400, 1371, 1283, 1256, 1175, 1138, 1115, 1064, 1028, 973, 903, 857, 807, 730 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 977.4120$ $[\text{M}]^+$, berechnet: 977.4157 $\text{C}_{50}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{17}$

Diethyl-2-(2-((4-(bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-3-(2-(2-(bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)benzyl)amino)-2-oxoethyl)benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-4,8-dicarboxylat (129)



25 (50.0 mg, 0.14 mmol) wurde in trockenem DCM (7 mL) gelöst. Oxalylchlorid (58 μL , 0.68 mmol, 5.0 eq.) wurde zugegeben und es wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Säure löst sich nicht vollständig in DCM, das Säurechlorid hingegen vollständig. Restliches Oxalylchlorid und das Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Das Säurechlorid wurde in trockenem DCM (5 mL) aufgenommen und zu einer Lösung aus **138** (94.3 mg, 0.15 mmol, 1.1 eq.), DIPEA (47.3 μL , 0.27 mmol, 2.0 eq.) und trockenem DCM (5 mL) bei 0 °C getropft. Die Lösung wurde 4 h bei RT gerührt, mit Wasser gequench und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittel Flashchromatographie (DCM/MeOH 100:1) gereinigt. Man erhielt **129** (100.0 mg, 0.10 mmol, 75%) als einen orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 $R_f = 0.24$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 6.83 - 6.69 (m, 4H, H-15, H-25, H-28, H-29), 6.69 - 6.60 (m, 3H, H-9, H-18, H-14), 6.48 (t, $^3J=5.4$ Hz, 1H, NH), 6.20 (s, 1H, H-1), 6.09 (s, 1H, H-1), 4.41 - 4.29 (m, 6H, H-12, H-6), 4.24 (s, 4H, H-23), 4.15 - 4.07 (m, 8H, H-19), 4.07 - 3.98 (m, 8H, H-21), 2.99 - 2.91 (m, 2H, H-10), 2.25 (s, 3H, H-27), 1.34 (t, $^3J=7.1$ Hz, 6H, H-7), 1.15 (dt, $^3J=3.8, 7.2$ Hz, 12H, H-22)

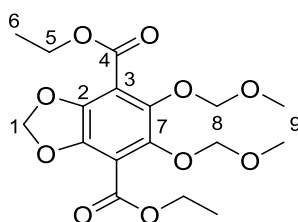
$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 171.5 (C-20), 171.4 (C-20), 166.0 (C-11), 161.6 (C-4), 150.3 (C-24), 150.3 (C-17), 141.9 (C-2), 141.0 (C-8), 138.8 (C-30), 136.8 (C-16), 132.0 (C-13), 131.7 (C-26), 121.8

(C-29), 120.8 (C-28), 119.4 (C-15), 119.0 (C-14), 114.4 (C-18), 113.2 (C-25), 110.6 (C-9), 103.1 (C-3), 103.0 (C-1), 67.3 (C-23), 67.1 (C-23), 61.5 (C-6), 60.6 (C-20), 60.6 (C-20), 53.5 (C-19), 53.3 (C-19), 43.3 (C-12), 42.0 (C-10), 20.8 (C-27), 14.2 (C-22), 14.0 (C-7)

IR: 3374, 2981, 2933, 2908, 2879, 1741, 1722, 1672, 1659, 1611, 1578, 1516, 1477, 1449, 1415, 1393, 1369, 1292, 1255, 1160, 1114, 1070, 1023, 965, 916, 857, 807, 730, 647, 588 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 981.3745$ $[M]^+$, berechnet: 981.3737 $\text{C}_{48}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_{19}$

5,6-Bis(methoxymethoxy)-1,3-benzodioxol-4,7-diethylester (**139**)^[38,150]



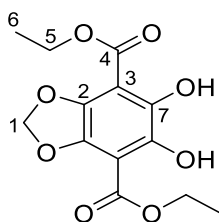
30 (1.9 g, 7.86 mmol) wurde in trockenem THF (200 mL) gelöst und auf $-60\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. *n*-BuLi (1.6 M, 12.3 mL, 19.65 mmol, 2.5 eq.) wurde über 40 min zugetropft. Es wurde für 60 min bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und danach für 10 min bei $35\text{ }^\circ\text{C}$. Nachdem Die Suspension wieder auf $-60\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt war, wurde Chloressigsäureethylester (98%, 1.19 mL, 19.65 mmol, 2.5 eq.) innerhalb 10 min zugetropft. Das Kältebad wurde entfernt. Die orange Lösung wurde mit einer gesättigten NH_4Cl -Lösung gewaschen und mit Et_2O extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 5:1) gereinigt. Man erhielt **139** (1.12 g, 2.27 mmol, 75%) als eine hellgelbe Flüssigkeit.

DC: PE:EE 3:1 $R_f = 0.25$

$^1\text{H NMR}$ (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 6.07 (s, 2H, H-1), 5.06 (s, 4H, H-8), 4.38 (q, $^3J=7.2\text{ Hz}$, 4H, H-5), 3.52 (s, 6H, H-9), 1.37 (t, $^3J=7.2\text{ Hz}$, 6H, H-6)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 162.7 (C-4), 143.3 (C-2), 142.2 (C-7), 113.3 (C-3), 102.7 (C-1), 100.3 (C-8), 61.6 (C-5), 57.7 (C-9), 14.1 (C-6)

IR: 2983, 2939, 2906, 2831, 1724, 1434, 1415, 1358, 1285, 1241, 1212, 1176, 1154, 1094, 1061, 1035, 1019, 981, 958, 924, 896, 870, 838, 749, 736 cm^{-1}

5,6-Dihydroxy-1,3-benzodioxol-4,7-diethylester (140)^[38,150]

139 (1.53 g, 3.95 mmol) und eine Spatelspitze *p*TsOH·H₂O wurden in MeOH (150 mL) gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit H₂O/DCM gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **140** (1.11 g, 3.73 mmol, 94%) als einen gelben, kristallinen Feststoff.

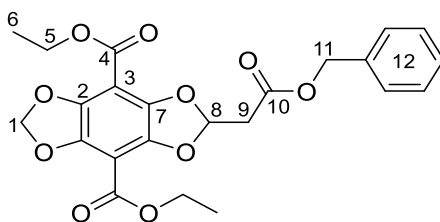
DC: PE:EE 2:1 *R_f* = 0.58

¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 10.39 (s, 2H, OH), 6.03 (s, 2H, H-1), 4.45 (d, ³*J*=7.2 Hz, 4H, H-5), 1.42 (t, ³*J*=7.2 Hz, 6H, H-6)

¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 168.2 (C-4), 143.0 (C-2), 139.2 (C-7), 103.1 (C-1), 101.9 (C-3), 62.3 (C-5), 14.1 (C-6)

F_p: 165 °C

MS: (EI) *m/z* = 298.0692 [M]⁺, berechnet: 298.0689 C₁₃H₁₄O₈

Diethyl 2-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dioxol)-4,8-dicarboxylat (141)^[38,150]

141 (1.03 g, 3.47 mmol) und **11** (583 mg, 3.64 mmol, 1.05 eq.) wurden in trockenem DCM (150 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von DMAP (635 mg, 5.20 mmol, 1.5 eq.) wurde die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (PE/EE 5:1 → 3:1) gereinigt. Man erhielt **141** (1.48 g, 3.22 mmol, 93%) als einen gelben Feststoff.

DC: PE:EE 2:1 *R_f* = 0.28

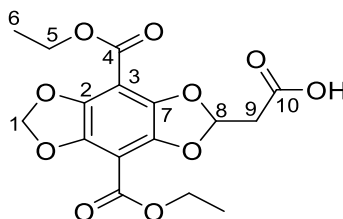
¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 7.35 (s, 5H, H-12), 6.69 (t, ³*J*=5.1 Hz, 1H, H-8), 6.11 (s, 2H, H-1), 5.19 (s, 2H, H-11), 4.37 (q, ³*J*=7.2 Hz, 4H, H-5), 3.13 (d, ³*J*=5.1 Hz, 2H, H-9), 1.35 (t, ³*J*=7.2 Hz, 6H, H-6)

^{13}C NMR (δ/ppm , 75 MHz, CDCl_3): 167.4 (C-4), 161.7 (C-10), 141.8 (C-2), 141.3 (C-7), 135.2 (C-12), 128.6 (C-12), 128.4 (C-12), 128.2 (C-12), 110.1 (C-8), 103.1 (C-1), 102.8 (C-3), 66.9 (C-11), 61.5 (C-5), 40.0 (C-9), 14.2 (C-6)

F_p: 156 °C

MS: (EI) m/z = 458.1211 $[\text{M}]^+$, berechnet: 458.1213 $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$

2-(4,8-Bis(ethoxycarbonyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis[[1,3]dioxol)-2-yl)essigsäure (25) ^[38,150]



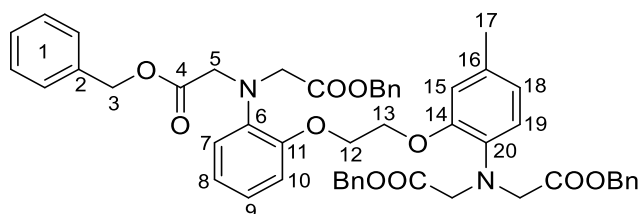
141 (1 g, 2.18 mmol) wurde in EE (150 mL) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Pd/C (10%) wurde die Suspension unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz, überwacht mittels Dünnschichtchromatographie, wurde die Suspension über Celite® abfiltriert, mit EE gewaschen und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH/HCOOH 10:1:0.1) gereinigt und man erhielt **25** (741 mg, 2.01 mmol, 92%) als einen gelben Feststoff.

DC: DCM/MeOH 20:1 R_f = 0.26

^1H NMR (δ/ppm , 300 MHz, CDCl_3): 6.67 (t, $^3J=4.9$ Hz, 1H, H-8), 6.12 (s, 2H, H-1), 4.39 (q, $^3J=7.2$ Hz, 4H, H-5), 3.13 (d, $^3J=4.9$ Hz, 2H, H-9), 1.38 (t, $^3J=7.1$ Hz, 6H, H-6)

MS: (EI) m/z = 368.0746 $[\text{M}]^+$, berechnet: 368.0743 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$

Dibenzyl-2,2'-((2-(2-(2-(bis(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)phenyl)-azandiyl)diacetat (143)



135 (2.0 g, 7.74 mmol), DIPEA (6.1 mL, 34.84 mmol, 4.5 eq.) und Benzyl-2-bromacetat (5.4 mL, 34.84 mmol, 4.5 eq.) wurden in ACN (15 mL) vorgelegt und 18 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung der rot-braunen Lösung wurde diese in EE (50 mL) gegossen und der entstandene weiße Fest-

stoff abfiltriert und verworfen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie-Chromatographie (PE/EE 5:1 -> 3:1) gereinigt. Man erhielt **143** (3.2 g, 3.78 mmol, 49%) als ein beiges Harz.

DC: PE:EE 3:1 $R_f = 0.47$

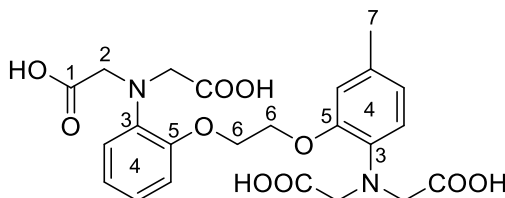
$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 7.37 - 7.23 (m, 20H, H-1), 6.95 - 6.86 (m, 4H, H-9, H-8, H-7, H-18), 6.83 - 6.77 (m, 1H, H-10), 6.72 - 6.65 (m, 2H, H-19, H-15), 5.06 (d, $^3J=4.3$ Hz, 8H, H-3), 4.28 - 4.12 (m, 13H, H-5), 2.29 (s, 3H, H-17)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 171.2 (C-4), 150.5 (C-11, C-14), 139.2 (C-1), 136.7 (C-6), 135.7 (C-20), 132.3 (C-16), 128.5 (C-1), 128.5 (C-1), 128.2 (C-1), 128.2 (C-1), 128.2 (C-1), 122.5 (C-8), 121.9 (C-19), 121.6 (C-18), 119.8 (C-9), 119.5 (C-7), 114.9 (C-15), 114.0 (C-10), 67.2 (C-13), 67.1 (C-12), 66.3 (C-3), 66.2 (C-3), 53.8 (C-5), 53.8 (C-5), 20.9 (C-17)

IR: 3064, 3033, 2936, 2884, 1734, 1596, 1505, 1455, 1415, 1374, 1347, 1242, 1213, 1153, 1064, 1045, 969, 810, 736, 696, 595 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 850.3445$ $[\text{M}]^+$, berechnet: = 850.3465 $\text{C}_{51}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_{10}$

2,2'-((2-(2-(2-(Bis(carboxymethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)phenyl)azandiyl)diessigsäure (149)



143 (50.0 mg, 58.76 μmol) wurde in EE (50 mL) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Pd/C (10%) wurde die Suspension unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) bei RT gerührt. Nach 3 h wurde die Suspension über Celite[®] abfiltriert, mit DCM und MeOH gewaschen und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhielt **149** (29.0 mg, 59.13 μmol , quant.) als einen weißen Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, MeOD): 7.03 - 6.80 (m, 6H, H-4, H-3, H-5), 6.68 (d, $^3J=8.1$ Hz, 1H, H-4, H-3, H-5), 4.32 (s, 4H, H-6), 4.05 (d, $^3J=13.9$ Hz, 8H, H-2), 2.27 (s, 3H, H-7)

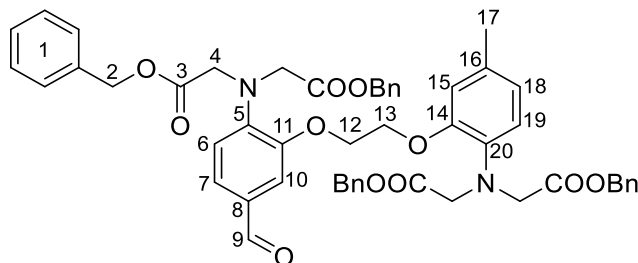
$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, MeOD): 176.1 (C-1), 152.2 (C-5), 152.1 (C-5), 140.5 (C-3), 137.8 (C-3), 134.3 (C-4), 123.9 (C-4), 122.9 (C-4), 122.6 (C-4), 120.8 (C-4), 120.3 (C-4), 115.7 (C-4), 115.1 (C-4), 68.6 (C-6), 68.4 (C-6), 56.3 (C-2), 56.0 (C-2), 21.2 (C-7)

F_p : Zersetzung über 75 $^\circ\text{C}$

IR: 3061, 2924, 1714, 1634, 1609, 1597, 1504, 1454, 1392, 1374, 1316, 1290, 1242, 1203, 1170, 1137, 1124, 1058, 1042, 967, 933, 869, 810, 746, 698, 682, 667, 595 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 491.1648$ $[M+H]^+$, berechnet: 491.1666 $C_{23}H_{27}N_2O_{10}$

Dibenzyl-2,2'-((2-(2-(2-(bis(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)amino)-5-formylphenoxy)ethoxy)-4-methylphenyl)azandiyl)diacetat (144)



143 (2.27 g, 2.67 mmol) wurde in einem Gemisch aus trockenem DMF/Pyridin (3 mL/0.28 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. $POCl_3$ (3.28 g, 21.37 mmol, 8.0 eq.) wurde tropfenweise zugefügt. Die schwarze Lösung wurde zunächst für 30 min bei RT gerührt, dann für 1h bei 60 °C und abschließend über Nacht bei RT. Die Mischung wurde auf ein Gemisch aus Eis/NaOH (aq.) gegossen. Die wässrige Phase wurde mehrmals mit DCM extrahiert und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden vereinigt, mit $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und im Hochvakuum (10^{-3} mbar) entfernt. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie (PE/EE 4:1) gereinigt. Man erhielt **144** (1.54 g, 1.75 mmol, 65%) als einen weißen Feststoff.

DC: PE:EE 3:1 $R_f = 0.25$

1H NMR (δ /ppm, 300 MHz, $CDCl_3$): 9.80 (s, 1H, H-9), 7.41 - 7.19 (m, 23H, H-1, H-6, H-7, H-10), 6.68 (s, 4H, H-15, H-18, H-19), 5.05 (d, $^3J=8.9$ Hz, 8H, H-2), 4.35 - 4.08 (m, 12H, H-4), 2.27 (s, 3H, H-17)

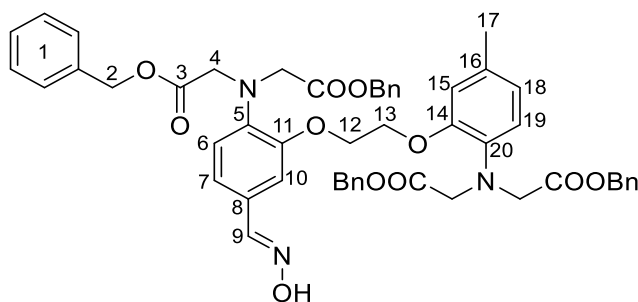
^{13}C NMR (δ /ppm, 75 MHz, $CDCl_3$): 190.5 (C-9), 171.1 (C-3), 170.4 (C-3), 150.4 (C-11), 149.7 (C-14), 144.8 (C-5), 136.7 (C-20), 135.6 (C-1), 135.4 (C-8), 132.4 (C-16), 128.5 (C-1), 128.4 (C-1), 128.2 (C-1), 126.4 (C-7), 122.2 (C-18), 120.0 (C-19), 116.9 (C-6), 115.2 (C-15), 111.5 (C-10), 67.4 (C-13), 66.9 (C-12), 66.7 (C-2), 66.3 (C-2), 54.0 (C-4), 53.8 (C-4), 20.9 (C-17)

F_p : 90-92 °C

IR: 3089, 3064, 3033, 2944, 2822, 2735, 1738, 1679, 1593, 1571, 1514, 1499, 1455, 1432, 1416, 1396, 1380, 1250, 1212, 1154, 1135, 1051, 1030, 970, 809, 792, 734, 696, 639, 583 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 878.3408$ $[M]^+$, berechnet: 878.3415 $C_{52}H_{50}N_2O_{11}$

Dibenzyl-2,2'-((2-(2-(2-(bis(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)amino)-5-((hydroxyimino)methyl)phenoxy)-ethoxy)-4-methylphenyl)azandiyl)-diacetat (145)



144 (1.0 g, 1.14 mmol) wurde in EtOH (10 mL) vorgelegt. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (161.3 mg, 2.28 mmol, 2.0 eq.) in H_2O (0.5 mL) und 3M NaOAc-Lösung (0.57 mL, 1.71 mmol, 1.5 eq.) wurden zugegeben. Die Lösung wurde für 4 h bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde schnell mittels Flashchromatographie (PE/EE 3:1) gereinigt. Man erhielt **145** (0.99 g, 1.1 mmol, 97%) als ein beiges Harz.

DC: PE:EE 3:1 $R_f = 0.17$

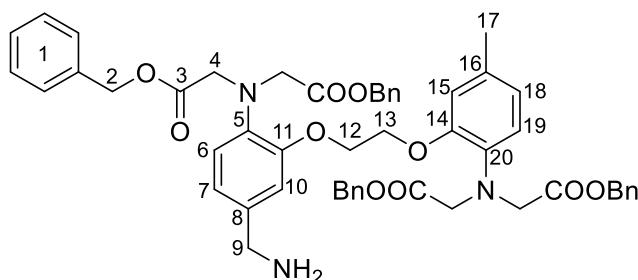
$^1\text{H NMR}$ (δ /ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8.02 (s, 1H, H-9), 7.39 - 7.18 (m, 21H, H-1, H-10), 6.99 - 6.90 (m, 1H, H-7), 6.85 - 6.63 (m, 4H, H-H-15, H-18, H-19, H-6), 5.05 (d, $^3J=3.6$ Hz, 8H, H-2), 4.19 (d, $^3J=11.1$ Hz, 12H, H-4), 2.27 (s, 3H, H-17)

$^{13}\text{C NMR}$ (δ /ppm, 75 MHz, CDCl_3): 171.3 (C-3), 170.9 (C-3), 150.6 (C-11), 150.3 (C-14), 149.8 (C-9), 140.9 (C-5), 136.7 (C-20), 135.6 (C-1), 135.5 (C-1), 132.5 (C-16), 128.5 (C-1), 128.5 (C-1), 128.3 (C-1), 128.2 (C-1), 128.2 (C-1), 125.9 (C-8), 122.1 (C-7), 121.8 (C-18), 120.1 (C-19), 118.4 (C-6), 115.1 (C-15), 110.6 (C-10), 67.4 (C-13), 67.1 (C-12), 66.5 (C-2), 66.3 (C-2), 53.9 (C-4), 53.8 (C-4), 20.9 (C-17)

IR: 3423, 3090, 3063, 3033, 2926, 1737, 1603, 1568, 1515, 1498, 1455, 1416, 1379, 1252, 1212, 1156, 1064, 1030, 960, 808, 732, 696, 625, 620, 613, 608 cm^{-1}

MS: (EI) $m/z = 916.3367$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet: 916.3421 $\text{C}_{52}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{Na}$

Dibenzyl-2,2'-((4-(aminomethyl)-2-(2-(2-(bis(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy)-ethoxy)phenyl)azandiyl)diacetat (146)



145 (447.0 mg, 0.53 mmol) und Zink-Staub (178.4 mg, 2.67 mmol, 5.0 eq.) wurden in AcOH (5 mL) für 6 h gerührt. DCM wurde zugegeben und der Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde am Rotationsver-

dampfer eingengt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH/NEt₃ 10:1:0.1) gereinigt. Man erhielt **146** (351.0 mg, 0.40 mmol, 75%) als ein beiges Harz.

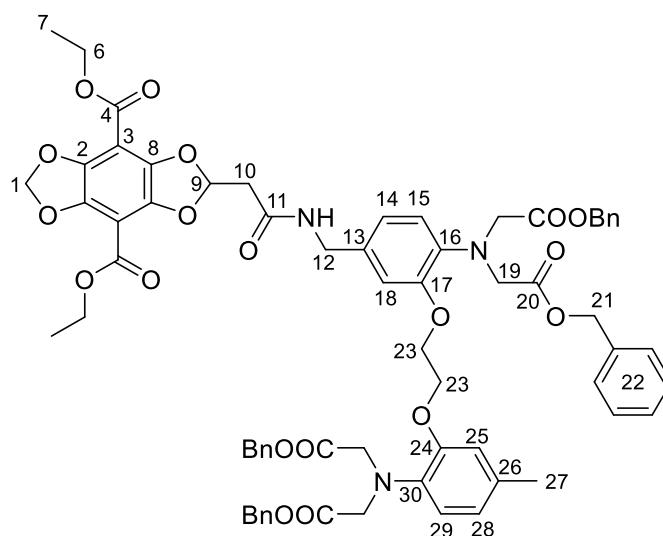
¹H NMR (δ/ppm, 300 MHz, CDCl₃): 7.39 - 7.18 (m, 20H, H-1), 6.97 (s, 1H, H-7), 6.88 - 6.74 (m, 3H, H-19, H-10, H-6), 6.68 (s, 2H, H-18, H-15), 5.03 (d, ³J=3.4 Hz, 8H, H-2), 4.30 - 4.06 (m, 12H, H-4), 3.97 - 3.82 (m, 2H, H-9), 2.27 (s, 3H, H-17)

¹³C NMR (δ/ppm, 75 MHz, CDCl₃): 171.2 (C-3), 171.0 (C-3), 150.5 (C-11), 150.4 (C-14), 139.0 (C-5), 136.4 (C-20), 135.6 (C-1), 135.5 (C-1), 132.6 (C-16), 128.5 (C-1), 128.4 (C-1), 128.3 (C-1), 128.2 (C-1), 122.0 (C-6), 121.4 (C-7), 120.0 (C-18), 119.3 (C-19), 114.9 (C-10), 114.1 (C-15), 67.4 (C-13), 67.1 (C-12), 66.4 (C-2), 66.3 (C-2), 53.8 (C-4), 53.7 (C-4), 20.9 (C-17)

IR: 3384, 3033, 2939, 2634, 1737, 1609, 1575, 1515, 1499, 1455, 1413, 1380, 1255, 1212, 1156, 1063, 1029, 969, 811, 735, 696 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 880.3845 [M+H]⁺, berechnet: 880.3809 C₅₂H₅₃N₃O₁₀

Diethyl-2-(2-((4-(bis(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)amino)-3-(2-(2-(bis(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)benzyl)amino)-2-oxoethyl)benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxol)-4,8-dicarboxylat (130)



Variante 1: **25** (30.0 mg, 81.5 μmol) wurde in trockenem DCM (3 mL) gelöst. Oxalylchlorid (35.0 μL, 0.41 mmol, 5.0 eq.) und trockenes DMF (1 μL, 8.2 μmol, 0.1 eq.) wurden zugegeben und es wurde für 4 h bei RT gerührt. Die Säure löst sich nicht vollständig in DCM, das Säurechlorid hingegen vollständig. Restliches Oxalylchlorid und das Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Das Säurechlorid wurde in trockenem DCM (3 mL) aufgenommen und zu einer Lösung aus **146** (78.8 mg, 89.6 μmol, 1.1 eq.), DIPEA (29.0 μL, 0.16 mmol, 2.0 eq.) und trockenem DCM (5 mL) bei 0 °C getropft. Die Lösung wurde 3 h bei RT gerührt, mit Wasser gequench und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdamp-

fer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **130** (56.0 mg, 45.5 μ mol, 56%) als einen orangen Feststoff.

Variante 2: **25** (50 mg, 0.13 mmol) wurde in trockenem DCM (20 mL) gelöst und es wurden **146** (119.5 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq.), DCC (33.6 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) und HOBt (22.0 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Die Lösung wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flashchromatographie (DCM/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **130** (50.0 mg, 40.6 μ mol, 30%) als einen orangen Feststoff.

DC: DCM/MeOH 25:1 R_f = 0.3

¹H NMR (δ /ppm, 300 MHz, CDCl₃): 7.39 - 7.18 (m, 20H, H-22), 6.77 (t, ³J=3.5 Hz, 4H, H-14, H-15, H-18, H-29), 6.72 - 6.61 (m, 3H, H-9, H-28, H-25), 6.42 (t, ³J=5.5 Hz, 1H, NH), 6.19 (d, ³J=1.1 Hz, 1H, H-1), 6.09 (d, ³J=1.1 Hz, 1H, H-1), 5.02 (d, ³J=7.7 Hz, 8H, H-21), 4.39 - 4.27 (m, 6H, H-6, H-12), 4.23 - 4.10 (m, 12H, H-19, H-23), 2.93 (d, ³J=4.7 Hz, 2H, H-10), 2.27 (s, 3H, H-27), 1.34 (t, ³J=7.2 Hz, 6H, H-7)

¹³C NMR (δ /ppm, 75 MHz, CDCl₃): 171.1 (C-20), 171.0 (C-20), 165.9 (C-11), 161.6 (C-4), 150.5 (C-24), 150.5 (C-17), 141.9 (C-2), 141.0 (C-8), 138.6 (C-30), 136.5 (C-16), 135.6 (C-22), 132.4 (C-13), 132.0 (C-26), 128.4 (C-22), 128.4 (C-22), 128.2 (C-22), 128.2 (C-22), 122.0 (C-29), 121.0 (C-28), 119.9 (C-15), 119.5 (C-14), 114.9 (C-18), 113.7 (C-25), 110.6 (C-9), 103.0 (C-1), 99.5 (C-3), 67.4 (C-23), 67.2 (C-23), 66.3 (C-21), 66.2 (C-21), 61.5 (C-6), 53.8 (C-19), 53.6 (C-19), 43.3 (C-12), 42.0 (C-10), 20.9 (C-27), 14.2 (C-7)

IR: 3376, 3064, 3034, 2927, 1723, 1674, 1610, 1579, 1516, 1498, 1452, 1415, 1393, 1368, 1351, 1294, 1279, 1259, 1213, 1160, 1076, 1026, 963, 737, 698 cm⁻¹

MS: (EI) m/z = 1230.4418 [M+H]⁺, berechnet: 1230.4447 C₆₈H₆₇N₃O₁₉

7 Abkürzungsverzeichnis

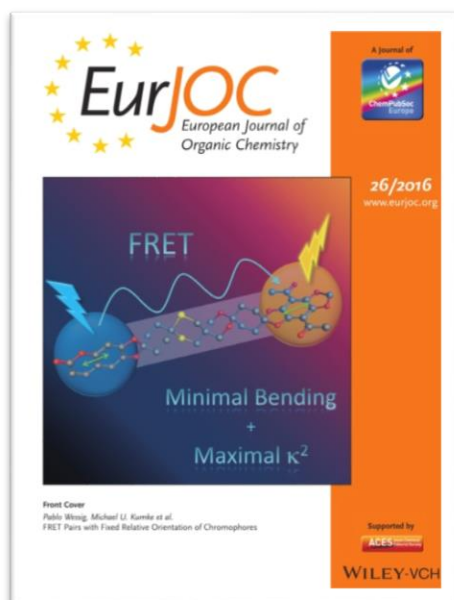
- [Ca²⁺]** freie Calciumkonzentration
- [Ca²⁺]_i** Freie intrazelluläre Calciumkonzentration
- 2P** Zweiphotonen
- 2PA** Zweiphotonenabsorption
- AcOH** Essigsäure
- AM** Acetoxymethyl-Ester
- Boc** tert-Butoxycarbonyl
- Boc₂O** Di-tert-butyldicarbonat
- bs** breites Singulett
- Ca²⁺** Calcium, Calcium-Kation
- d** Dublett
- DABCO** 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
- DC** Dünnschichtchromatographie
- DCM** Dichlormethan
- DIBAL** Diisobutylaluminiumhydrid
- DIPEA** Diisopropylethylamin
- DMAP** 4-(Dimethylamino)-pyridin
- DMF** N,N-Dimethylformamid
- DMSO** Dimethylsulfoxid
- EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure
- EE** Ethylacetat
- EGTA** Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
- EI** Elektronenstoßionisation
- eq.** Äquivalent
- ESI** Elektronensprayionisation
- EtOH** Ethanol
- FLIM** Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie, *fluorescence lifetime imaging microscopy*
- F_p** Schmelzpunkt (fusion point)
- FRET** Förster-Resonanz-Energie-Transfer
- GFP** Grün Fluoreszierendes Protein
- h** Stunde
- HATU** O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uroniumhexa-fluorophosphat

HOBt	N-Hydroxybenzotriazol
HOMO	höchste besetzte Molekülorbital, <i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC	innere Konversion, <i>internal conversion</i>
IR	innere Relaxation, <i>internal relaxation</i>
IR	Infrarotspektroskopie
IRF	Instrument-Antwort-Funktion, <i>instrument response function</i>
ISC	Interkombination, <i>intersystem crossing</i>
LiAlH₄	Lithiumaluminiumhydrid
LSM	Lösungsmittel
LUMO	niedrigste unbesetzte Molekülorbital, <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation – Time-Of-Flight
MeOH	Methanol
min	Minuten
Mmt	Monomethoxytrityl
MOM	Methoxymethyl
MOMBr	Brommethylmethylether
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Wiederholungen
NaOAc	Natriumacetat
<i>n</i>BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NIR	nahinfrarot
NMR	nuclear magnetic resonance
OSK	Oligospiroketal
OSTK	Oligospirothioketal
PET	photoinduzierter Elektrontransfer
Ph	Benzol
Piv	2,2-Dimethylpropanoyl, Pivaloyl
PPTSA	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
<i>p</i>TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
quint.	Quintett
R_f	Laufwert
s	Singulett
S₀	elektronischer Grundzustand

S₁	erster elektronisch angeregter Zustand
SE	Standardabweichung
STED	stimulated emission depletion- Mikroskopie
t	Triplet
TBDMSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetra-fluoroborat
tBuOH	<i>tert</i> -Butanol
TCSPC	zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung, <i>time-correlated single photon counting</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSCI	Trimethylsilylchlorid
TMSOTf	Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester
Triton X-100	<i>tert</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol
UV	Ultraviolett
Φ_F·ε	Brightness, Helligkeit

8 Publikationen

P. Wessig, **N. Behrends**, M. U. Kumke, U. Eisold, T. Meiling, C. Hille, "Two-Photon FRET Pairs based on Coumarin and DBD dyes" *RSC Advances* **2016**, *6*, 33510–33513 DOI:10.1039/c6ra03983a



P. Wessig, **N. Behrends**, M. U. Kumke, U. Eisold "FRET Pairs with Fixed Relative Orientation of Chromophores" *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *26*, 4476–4486
DOI: 10.1002/ejoc.201600489

Front Cover: "FRET Pairs with Fixed Relative Orientation of Chromophores" (*Eur. J. Org. Chem.* **26/2016**)

U. Eisold, **N. Behrends**, P. Wessig, M. U. Kumke "Rigid Rod-Based FRET Probes for Membrane Sensing Applications" *J. Phys. Chem.* **2016**, *120*, 9935–9943
DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b07285

9 Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Pablo Wessig, der mir die Möglichkeit eröffnete, dieses interessante Dissertationsthema in seinem Arbeitskreis zu untersuchen. Besonders danke ich ihm für die vielen hilfreichen und motivierenden Gespräche und Ideen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Arbeitskreises der Bioorganischen Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den zahlreichen Diskussionen und den amüsanten Pausen bedanken. Vor allem danke ich an dieser Stelle meinem ehemaligen Bürokollegen Sebastian Hübner und meiner direkten Laborkollegin Monique Mertens für die stetige Unterstützung und die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch apl. Prof. Dr. Michael U. Kumke und Ursula Eisold von der Arbeitsgruppe für Physikalische Chemie der Universität Potsdam, für die inspirierende und erfolgreiche Zusammenarbeit und die zahlreichen spektroskopischen Untersuchungen.

Ebenfalls aus der Physikalischen Chemie danke ich Dr. Carsten Hille für die Durchführung der Ca^{2+} -sensitiven Messungen und der Hilfestellung auf diesem Gebiet.

Mein Dank gilt auch dem Arbeitskreis der Analytischen Chemie der Universität Potsdam für die Messung zahlreicher NMR und Massenspektren.

Für die Durchführung von TGA- und DSC-Messungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Dirk Schanzenbach und bei der Arbeitsgruppe Supramolekulare Chemie der Universität Potsdam von Herrn Prof. Dr. Andreas Taubert.

Für die Übernahme der Gutachten gilt mein Dank apl. Prof. Dr. Michael U. Kumke und Herrn Prof. Dr. Rainer Beckert.

Abschließend möchte ich mich bei meiner liebevollen Familie und meinem Freund Florian bedanken, die mich in jeder Lebenslage unterstützen und immer ein offenes Ohr für mich haben.

10 Literaturverzeichnis

- [1] I. Nikic, D. Merkler, C. Sorbara, M. Brinkoetter, M. Kreutzfeldt, F. M. Bareyre, W. Bruck, D. Bishop, T. Misgeld, M. Kerschensteiner, *Nature Medicine* **2011**, *17*, 495–499.
- [2] H. Tong, K. Lou, W. Wang, *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2015**, *5*, 25–33.
- [3] D. Bera, L. Qian, T.-K. Tseng, P. H. Holloway, *Materials* **2010**, *3*, 2260–2345.
- [4] S. Faulkner, Pope, Simon J. A., Burton-Pye, Benjamin P., *Applied Spectroscopy Reviews* **2005**, *40*, 1–31.
- [5] T. Müller, C. Schumann, A. Kraegeloh, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 1986–2000.
- [6] Y. Sun, R. N. Day, A. Periasamy, *Nature Protocols* **2011**, *6*, 1324–1340.
- [7] M. D. Brenner, R. Zhou, T. Ha, *Biopolymers* **2011**, *95*, 332–344.
- [8] G. H. Altman, R. L. Horan, I. Martin, J. Farhadi, Stark, Peter R. H., V. Volloch, J. C. Richmond, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan, *The FASEB Journal* **2001**.
- [9] K. Grote, I. Flach, M. Luchtefeld, E. Akin, S. M. Holland, H. Drexler, B. Schieffer, *Circulation Research* **2003**, *92*, e80.
- [10] J. Wolff, *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, Hirschwald Verlag, Berlin **1892**.
- [11] D. E. Ingber, *The FASEB Journal* **2006**, *20*, 811–827.
- [12] J. Rubin, C. Rubin, C. R. Jacobs, *Gene* **2006**, *367*, 1–16.
- [13] J. H. C. Wang, B. P. Thampatty, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **2006**, *5*, 1–16.
- [14] C. Yang, X. Zhang, Y. Guo, F. Meng, F. Sachs, J. Guo, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1853*, 1889–1904.
- [15] J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, C. S. Chen, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 1484–1489.
- [16] C. Moraes, Y. Sun, C. A. Simmons, *Journal of Visualized Experiments : JoVE* **2010**, 2224.
- [17] S. Munevar, Y. Wang, M. Dembo, *Biophysical Journal* **2001**, *80*, 1744–1757.
- [18] D. Kirmizis, S. Logothetidis, *International Journal of Nanomedicine* **2010**, *5*, 137–145.
- [19] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, *Science* **1987**, *235*, 1517–1520.
- [20] G. Jiang, G. Giannone, D. R. Critchley, E. Fukumoto, M. P. Sheetz, *Nature* **2003**, *424*, 334–337.
- [21] S. B. Smith, L. Finzi, C. Bustamante, *Science* **1992**, *258*, 1122–1126.
- [22] H. Shroff, B. M. Reinhard, M. Siu, H. Agarwal, A. Spakowitz, J. Liphardt, *Nano Letters* **2005**, *5*, 1509–1514.
- [23] C. Grashoff, B. D. Hoffman, M. D. Brenner, R. Zhou, M. Parsons, M. T. Yang, M. A. McLean, S. G. Sligar, C. S. Chen, T. Ha et al., *Nature* **2010**, *466*, 263–266.
- [24] Y. Wang, F. Meng, F. Sachs, *Communicative & Integrative Biology* **2011**, *4*, 385–390.
- [25] F. Meng, T. M. Suchyna, F. Sachs, *FEBS Journal* **2008**, *275*, 3072–3087.

- [26] J. Rahimzadeh, F. Meng, F. Sachs, J. Wang, D. Verma, S. Z. Hua, *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2011**, *301*, C646-C652.
- [27] N. Borghi, M. Sorokina, O. G. Shcherbakova, W. I. Weis, B. L. Pruitt, W. J. Nelson, A. R. Dunn, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 12568–12573.
- [28] J. Guo, Y. Wang, F. Sachs, F. Meng, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, E5252.
- [29] C. Jurchenko, K. S. Salaita, *Molecular and Cellular Biology* **2015**, *35*, 2570–2582.
- [30] K. Jahn, V. Buschmann, F. Koberling, C. Hille, *Proc. SPIE* **2014**, *8947*, 894714.
- [31] K. Jahn, C. Hille, *PLOS ONE* **2014**, *9*, e105334.
- [32] C. Hille, M. Berg, L. Bressel, D. Munzke, P. Primus, H.-G. Löhmannsröben, C. Dosche, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 1871–1879.
- [33] K. Sagolla, H.-G. Löhmannsröben, C. Hille, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 8525–8537.
- [34] C. Hille, M. Lahn, H.-G. Lohmannsroben, C. Dosche, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, *8*, 319–327.
- [35] M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2641–2684.
- [36] J. Widengren, V. Kudryavtsev, M. Antonik, S. Berger, M. Gerken, Seidel, Claus A. M., *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 2039–2050.
- [37] P. Wessig, R. Wawrzinek, K. Möllnitz, E. Feldbusch, U. Schilde, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 6192–6195.
- [38] R. Wawrzinek, J. Ziolkowska, J. Heuveling, M. Mertens, A. Herrmann, E. Schneider, P. Wessig, *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 17349–17357.
- [39] D. Bader, Klier, D. T., C. Hettrich, Bier, F. F., P. Wessig, *Analytical Methods* **2016**, *8*, 1235–1238.
- [40] R. Wawrzinek, P. Wessig, K. Möllnitz, J. Nikolaus, R. Schwarzer, P. Müller, A. Herrmann, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 5367–5371.
- [41] C. Meyners, M. Mertens, P. Wessig, F.-J. Meyer-Almes, *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23*, 3107–3116.
- [42] P. Wessig, K. Möllnitz, *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 4452–4457.
- [43] B. Albinsson, J. K. Hannestad, K. Börjesson, *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256*, 2399–2413.
- [44] N. Venkatesan, Y. Jun Seo, B. Hyeon Kim, *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 648–663.
- [45] C. Grimm, T. Meyer, S. Czaplá, J. Nikolaus, H. A. Scheidt, A. Vogel, A. Herrmann, P. Wessig, D. Huster, P. Müller, *Chemistry - A European Journal* **2013**, *19*, 2703–2710.
- [46] P. Wessig, R. Merkel, P. Müller, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2015**, *11*, 74–84.

- [47] P. F. H. Schwab, J. R. Smith, J. Michl, *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1197–1280.
- [48] N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Accounts of Chemical Research* **2005**, *38*, 79–87.
- [49] F. Meng, F. Sachs, *Journal of Cell Science* **2011**, *125*, 743–750.
- [50] J. M. Tour, *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 791–804.
- [51] J. M. Tour, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 537–554.
- [52] P. Wessig, K. Möllnitz, C. Eiserbeck, *Chemistry - A European Journal* **2007**, *13*, 4859–4872.
- [53] P. Pfeiffer, P. Backes, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1928**, *61*, 434–435.
- [54] P. Pfeiffer, R. Seydel, A. Hansen, *Journal für Praktische Chemie-Leipzig* **1929**, *123*, 347–350.
- [55] P. Wessig, K. Möllnitz, *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 3907–3920.
- [56] T. Tsunoda, M. Suzuki, R. Noyori, *Tetrahedron Letters* **1980**, *21*, 1357–1358.
- [57] P. Müller, J. Nikolaus, S. Schiller, A. Herrmann, K. Möllnitz, S. Czapla, P. Wessig, *Angewandte Chemie* **2009**, *121*, 4497–4500.
- [58] J. Nikolaus, S. Czapla, K. Möllnitz, C. T. Höfer, A. Herrmann, P. Wessig, P. Müller, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, *1808*, 2781–2788.
- [59] A. Techen, S. Czapla, K. Möllnitz, D. Budach, P. Wessig, M. U. Kumke, *Helvetica Chimica Acta* **2013**, *96*, 2046–2067.
- [60] P. Wessig, M. Gerngroß, D. Freyse, P. Bruhns, M. Przedziak, U. Schilde, A. Kelling, *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81*, 1125–1136.
- [61] P. Wessig, D. Budach, A. F. Thünemann, *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 10466–10471.
- [62] E. W. Dean, D. D. Stark, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **1920**, *12*, 486–490.
- [63] M. C. Murguía, R. J. Grau, *Synlett* **2001**, *2001*, 1229–1232.
- [64] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 2708–2711.
- [65] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [66] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2952–3015.
- [67] N. V. Tsarevsky, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3558–3561.
- [68] M. J. Joralemon, R. K. O'Reilly, J. B. Matson, A. K. Nugent, C. J. Hawker, K. L. Wooley, *Macromolecules* **2005**, *38*, 5436–5443.
- [69] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 1095–1099.
- [70] J.-F. Lutz, *Angewandte Chemie* **2007**, *119*, 1036–1043.
- [71] B. H. Lipshutz, B. R. Taft, *Angewandte Chemie* **2006**, *118*, 8415–8418.

- [72] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 210–216.
- [73] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, Finn, M. G., *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 2250–2255.
- [74] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–460.
- [75] A. Makarem, R. Berg, F. Rominger, B. F. Straub, *Angewandte Chemie* **2015**, *127*, 7539–7543.
- [76] H. J. Backer, N. Evenhuis, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1937**, *56*, 681–690.
- [77] H. J. Backer, G. L. Wiggerink, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1941**, *60*, 453–473.
- [78] M. Gerngroß, Dissertation - Untersuchungen zur Herstellung poröser Materialien durch Acetalisierungsreaktionen, *Universität Potsdam* **2014**.
- [79] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **1852**, *142*, 463–562.
- [80] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer New York, **2006**.
- [81] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, *9*, 14–19.
- [82] T. Förster, *Annalen der Physik* **1948**, *437*, 55–75.
- [83] D. Shrestha, A. Jenei, P. Nagy, G. Vereb, J. Szöllösi, *Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies*, **2015**.
- [84] R. E. Dale, J. Eisinger, W. E. Blumberg, *Biophysical Journal* **1979**, *26*, 161–193.
- [85] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, Drummen, Gregor P. C., *Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*, **2012**.
- [86] B. W. van der Meer, *FRET in Biology* **2002**, *82*, 181–196.
- [87] D. B. VanBeek, M. C. Zwier, J. M. Shorb, B. P. Krueger, *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 4168–4178.
- [88] P. Wessig, N. Behrends, M. U. Kumke, U. Eisold, *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, *2016*, 4476–4486.
- [89] H. Langhals, A. J. Esterbauer, A. Walter, E. Riedle, I. Pugliesi, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16777–16782.
- [90] K. Kinoshita, S. Kawato, A. Ikegami, *Biophysical Journal* **1977**, *20*, 289–305.
- [91] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, WILEY-VCH, **2001**.
- [92] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch, H. Heinz, „Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie“, Carl Zeiss Jena.
- [93] J. W. Lichtman, J.-A. Conchello, *Nature Methods* **2005**, *2*, 910–919.
- [94] K. W. Dunn, P. A. Young, *Nephron Experimental Nephrology* **2006**, *103*, e33.
- [95] A. Ustione, D. W. PISTON, *Journal of Microscopy* **2011**, *243*, 221–226.
- [96] M. Göppert-Mayer, *Annalen der Physik* **1931**, *401*, 273–294.
- [97] W. Kaiser, Garrett, C. G. B., *Physical Review Letters* **1961**, *7*, 229–231.
- [98] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76.

- [99] S. Sakadić, U. Demirbas, T. R. Mempel, A. Moore, S. Ruvinskaya, D. A. Boas, A. Sennaroglu, F. X. Kartner, J. G. Fujimoto, *Optics express* **2008**, *16*, 20848–20863.
- [100] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1369–1377.
- [101] F. Helmchen, W. Denk, *Nat Meth* **2005**, *2*, 932–940.
- [102] S. Kawata, Y. Kawata, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 1777–1788.
- [103] D. A. Parthenopoulos, P. M. Rentzepis, *Science* **1989**, *245*, 843–845.
- [104] C. N. LaFratta, J. T. Fourkas, T. Baldacchini, R. A. Farrer, *Angewandte Chemie* **2007**, *119*, 6352–6374.
- [105] G. C. R. Ellis-Davies, *Nature Methods* **2007**, *4*, 619–628.
- [106] C. W. Spangler, *Journal of Materials Chemistry* **1999**, *9*, 2013–2020.
- [107] J. Cui, R. A. Gropeanu, D. R. Stevens, J. Rettig, A. d. Campo, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 7733–7740.
- [108] T. Egawa, K. Hirabayashi, Y. Koide, C. Kobayashi, N. Takahashi, T. Mineno, T. Terai, T. Ueno, T. Komatsu, Y. Ikegaya et al., *Angewandte Chemie* **2013**, *125*, 3966–3969.
- [109] G. Gryniewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440–3450.
- [110] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, *273*, 1392–1395.
- [111] C. Cullander, *Journal of Microscopy* **1994**, *176*, 281–286.
- [112] I. Johnson, *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition*, Life Technologies Corporation, **2010**.
- [113] M. Zonta, G. Carmignoto, *Journal of Physiology-Paris* **2002**, *96*, 193–198.
- [114] J. A. Morales, J. L. Ram, J. Song, R. A. Brown, *Toxicology and Applied Pharmacology* **1997**, *143*, 70–74.
- [115] M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2000**, *1*, 11–21.
- [116] A. P. Thomas, *Methods* **2008**, *46*, 141–142.
- [117] R. Y. Tsien, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2396–2404.
- [118] A. Mithöfer, C. Mazars, *Biological Procedures Online* **2002**, *4*, 105–118.
- [119] G. J. Kavarnos, N. J. Turro, *Chemical Reviews* **1986**, *86*, 401–449.
- [120] A. P. de Silva, T. S. Moody, G. D. Wright, *Analyst* **2009**, *134*, 2385–2393.
- [121] J. Yin, Y. Hu, J. Yoon, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 4619–4644.
- [122] R. Tsien, *Calcium as a Cellular Regulator, Kapitel Monitoring Cell Calcium, 28 - 54*, Oxford University Press, **1999**.
- [123] M. Evans, C. Sewter, E. Hill, *Assay Drug Dev Technol* **2004**, *1*, 199–207.
- [124] K. Hoffmann, T. Behnke, M. Grabolle, U. Resch-Genger, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 3315–3322.

- [125] J. P. Nolan, F. Mandy, *Cytometry Part A* **2006**, 69A, 318–325.
- [126] F. Just, B. Walz, *Journal of Morphology* **1994**, 220, 35–46.
- [127] B. Walz, O. Baumann, C. Krach, A. Baumann, W. Blenau, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **2006**, 62, 141–152.
- [128] K. Jahn, C. Hille, xxx, *PLOS ONE* **2014**, 9, e105334.
- [129] Gupta B. L., Hall T. A., *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **1983**, 244, R176-R186.
- [130] C. Hille, Dissertation - Charakterisierung von Transportmechanismen in der Speicheldrüse der Schabe *Periplaneta americana*, *Universität Potsdam* **2006**.
- [131] S. M. Sethna, N. M. Shah, *Chemical Reviews* **1945**, 36, 1–62.
- [132] D. B. Wagner, *Molecules* **2009**, 14, 210–237.
- [133] L. Zhang, S. Dong, L. Zhu, *Chemical Communications* **2007**, 1891–1893.
- [134] X. Ariza, O. Pineda, J. Vilarrasa, Shipps,, Gerald W., Y. Ma, X. Dai, *Organic Letters* **2001**, 3, 1399–1401.
- [135] C. Chalumeau, D. Deffieux, S. Chaignepain, S. Quideau, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1193–1197.
- [136] M.-J. Fan, G.-Q. Li, L.-H. Li, S.-D. Yang, Y.-M. Liang, *Synthesis* **2006**, 2006, 2286–2292.
- [137] I. Yavari, S. Souri, M. Sirouspour, H. Djahaniani, *Synthesis* **2006**, 2006, 3243–3249.
- [138] K. Möllnitz, Dissertation - Synthese und Untersuchung von molekularen Stäben basierend auf Oligospiroketalen, *Universität Potsdam* **2012**.
- [139] F. D. Ayres, S. I. Khan, O. L. Chapman, S. N. Kaganove, *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, 7151–7154.
- [140] H. D. Srinivas, P. Maity, Yap, Glenn P. A., M. P. Watson, *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, 80, 4003–4016.
- [141] E. Andriolo, M. Montorsi, S. Rancan, E. Mariani, EP2019114 A1.
- [142] N. Ikemoto, S. L. Schreiber, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112, 9657–9659.
- [143] C. A. A. van Boeckel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Letters* **1979**, 20, 3561–3564.
- [144] A. Takadate, T. Masuda, C. Murata, T. Tanaka, M. Irikura, S. Goya, *Analytical Sciences* **1995**, 11, 97–101.
- [145] J. R. Heldt, J. Heldt, M. Stoń, H. A. Diehl, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1995**, 51, 1549–1563.
- [146] K. Muthuramu, V. Ramamurthy, *Journal of Photochemistry* **1984**, 26, 57–64.
- [147] U. Eisold, N. Behrends, P. Wessig, M. U. Kumke, *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, 120, 9935–9943.
- [148] F. Dallacker, G. Sanders, *Chemiker-Zeitung* **1986**, 110, 369–371.
- [149] F. Dallacker, G. Schmets, *Chemische Berichte* **1971**, 104, 2534–2544.

- [150] R. Wawrzinek, Dissertation - Fluoreszenzfarbstoffe mit Dioxolobenzodioxol-Grundgerüst: Synthese, Untersuchungen und Anwendungen, *Universität Potsdam* **2013**.
- [151] L. John, Masterarbeit - Synthese und Charakterisierung von neuen Fluoreszenzfarbstoffen, *Universität Potsdam* **2016**.
- [152] D. Gericke, Bachelorarbeit - Synthese und Untersuchung neuartiger Fluoreszenzfarbstoffe, *Universität Potsdam* **2011**.
- [153] J. M. Dixon, M. Taniguchi, J. S. Lindsey, *Photochemistry and Photobiology* **2005**, *81*, 212–213.
- [154] S. Samajdar, M. K. Basu, F. F. Becker, B. K. Banik, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 4425–4427.
- [155] R. V. Valiulin, A. G. Kutateladze, *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 6393–6396.
- [156] A. Kamal, G. Chouhan, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 1347–1350.
- [157] V. Kumar, S. Dev, *Tetrahedron Letters* **1983**, *24*, 1289–1292.
- [158] R. Merkel, Dissertation - Untersuchung zur Synthese und Eigenschaften von komplexen Oligospiroketalen, *Universität Potsdam* **2014**.
- [159] G. K. Bains, S. H. Kim, E. J. Sorin, V. Narayanaswami, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6207–6219.
- [160] G. Stork, K. Zhao, *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 287–290.
- [161] R.C. Srinivasa, M. Chandrasekharam, H. Ila, H. Junjappa, *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 8163–8164.
- [162] Z. Wang in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc, **2012**.
- [163] S. Mourtas, D. Gatos, V. Kalaitzi, C. Katakalous, K. Barlos, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 6965–6967.
- [164] F. Belluti, G. Fontana, L. D. Bo, N. Carenini, C. Giommarelli, F. Zunino, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 3543–3550.
- [165] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [166] H. Takano, T. Narumi, W. Nomura, T. Furuta, H. Tamamura, *Organic Letters* **2015**, *17*, 5372–5375.
- [167] Q. Zou, Y. Fang, Y. Zhao, H. Zhao, Y. Wang, Y. Gu, F. Wu, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 5288–5294.
- [168] Y. Zhao, Q. Zheng, K. Dakin, K. Xu, M. L. Martinez, W.-H. Li, *Journal of the Chemical Society* **2004**, *126*, 4653–4663.
- [169] P. Wessig, N. Behrends, M. U. Kumke, U. Eisold, T. Meiling, C. Hille, *RSC Advances* **2016**, *6*, 33510–33513.
- [170] M. Lahn, C. Dosche, C. Hille, *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2011**, *300*, C1323.
- [171] X. Dong, Y. Yang, J. Sun, Z. Liu, B.-F. Liu, *Chemical Communications* **2009**, 3883–3885.

- [172] A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter, B. Herman, *Physiological Reviews* **1999**, *79*, 1089–1125.
- [173] R. Y. Tsien, *Nature* **1981**, *290*, 527–528.
- [174] R. Y. Tsien, T. Pozzan, T. J. Rink, *The Journal of Cell Biology* **1982**, *94*, 325–334.
- [175] Harrison, S. M., Bers, D. M., *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **1989**, *256*, C1250–C1256.
- [176] S. M. Harrison, D. M. Bers, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1987**, *925*, 133–143.
- [177] A. Uto, H. Arai, Y. Ogawa, *Cell Calcium* **1991**, *12*, 29–37.
- [178] F. A. Lattanzio, D. K. Bartschat, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *177*, 184–191.
- [179] A. E. Oliver, G. A. Baker, R. D. Fugate, F. Tablin, J. H. Crowe, *Biophysical Journal* **2000**, *78*, 2116–2126.
- [180] D. Larsson, B. Larsson, T. Lundgren, K. Sundell, *Analytical Biochemistry* **1999**, *273*, 60–65.
- [181] R. Tsien, T. Pozzan in *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1989**.
- [182] R. Pethig, M. Kuhn, R. Payne, E. Adler, T.-H. Chen, L. F. Jaffe, *Cell Calcium* **1989**, *10*, 491–498.
- [183] M. Gersbach, D. L. Boiko, C. Niclass, C. C. H. Petersen, E. Charbon, *Optics Letters* **2009**, *34*, 362–364.
- [184] A. V. Agronskaia, L. Tertoolen, H. C. Gerritsen, *Journal of Biomedical Optics* **2004**, *9*, 1230–1237.
- [185] A. Sillen, Y. Engelborghs, *Photochemistry and Photobiology* **1998**, *67*, 475–486.
- [186] J. R. Lakowicz, H. Szmazinski, M. L. Johnson, *Journal of Fluorescence* **1992**, *2*, 47–62.
- [187] I. Lang, B. Walz, *Journal of Experimental Biology* **1999**, *202*, 729–738.
- [188] M. Mertens, Dissertation - Anwendungsorientierte Entwicklung neuer DBD-Derivate, *Universität Potsdam* **2017**.
- [189] W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals 6th ed.*, Elsevier / Butterworth-Heinemann: Boston, **2009**.
- [190] R. Carrillo, L. G. León, T. Martín, V. S. Martín, V. S., J. M. Padrón, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 780–783.
- [191] Y. C. Fan, O. Kwon, *Organic Letters* **2012**, *14*, 3264–3267.
- [192] F. D. Ayres, S. I. Khan, O. L. Chapman, S. N. Kaganove, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 7151–7154.
- [193] H. H. Hussain, G. Babic, T. Durst, J. S. Wright, M. Flueraru, A. Chichirau, L. L. Chepelev, *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 7023–7032.
- [194] Y. Q. Ye, H. Koshino, J.-i. Onose, K. Yoshikawa, N. Abe, S. Takahashi, *Organic Letters* **2007**, *9*, 4131–4134.

- [195] D. Tsuchiya, K. Moriyama, H. Togo, *Synlett* **2011**, 2011, 2701-2704.
- [196] J. Wang, M. Uttamchandani, J. Li, M. Hu, S. Q. Yao, *Chemical Communications* **2006**, 3783–3785.
- [197] J. R. Schaeffer, R. E. Stevens, *The Journal of Organic Chemistry* **1973**, 38, 1241–1243.
- [198] N. Behrends, Masterarbeit - Synthese von Dendrimeren mit OSK-Bausteinen durch Festphasensynthese, *Universität Potsdam* **2012**.
- [199] D. Budach, Dissertation - Synthese von Dendrimeren aus Oligospiroketal-Bausteinen, *Universität Potsdam* **2014**.
- [200] N. Jacobsen, L.-E. K. Pedersen, *Pesticide Science* **1983**, 14, 90–97.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Dissertation im Zeitraum vom 01.02.2013 bis 23.11.2017 am Institut für Chemie - Arbeitskreis für Bioorganische Chemie - der Universität Potsdam von mir selbst durchgeführt wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

Potsdam, den 23.11.2017